



## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

|   |           |  |
|---|-----------|--|
| (51) International Patent Classification:<br><b>C12Q 1/68</b> | <b>A2</b> | (11) International Publication Number:<br><b>WO 01/04352</b>         |
|   |           | (43) International Publication Date:<br>18 January 2001 (18.01.2001) |

(21) International Application Number: PCT/IB00/00918

(22) International Filing Date: 07 July 2000 (07.07.2000)

(30) Priority Data:  
1277/99 09 July 1999 (09.07.1999) CH(60) Parent Application or Grant  
MISEREZ, André, R. [/]; (). MISEREZ, André, R. [/]; (). E.  
BLUM & CO.; ().

Published

(54) Title: DNA POLYMORPHISMS IN STEROL REGULATOR ELEMENT BINDING PROTEINS  
(54) Titre: POLYMORPHISMES DANS L'ADN DE PROTEINES DE FIXATION A UN ELEMENT REGULATEUR DE STEROL

## (57) Abstract

The invention relates to DNA polymorphisms in sterol regulator element binding proteins (SREBP) that are characteristic of a higher risk of genetic diseases in humans such as hypercholesterolaemia. The corresponding polymorphisms, especially the polymorphisms on SREBP-1 and SREBP-2 are frequently observed in Alzheimer patients (SREBP-2). They are also characterized by a specific behavior in the therapy of HIV patients with protease inhibitors and appear to have an influence on the mortality.

## (57) Abrégé

La présente invention concerne des polymorphismes de protéines de fixation à un élément régulateur de stérol (SREBP) qui sont caractéristiques de maladies génétiques à risque élevé chez l'homme, telles que l'hypercholestérolémie. Les polymorphismes correspondants, notamment des polymorphismes de protéines SREBP-1 et SREBP-2, présentent également une fréquence très intéressante chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (SREBP-2), un comportement spécifique lors d'une thérapie avec des inhibiteurs de protéase, appliquée à des patients atteint du VIH, ainsi qu'une influence sur la mortalité.



(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
18. Januar 2001 (18.01.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 01/04352 A2

(51) Internationale Patentklassifikation: C12Q 1/68

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/IB00/00918

(22) Internationales Anmeldedatum:  
7. Juli 2000 (07.07.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
1277/99 9. Juli 1999 (09.07.1999) CH

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: MISEREZ, André, R. [CH/CH]; St. Jakob-  
strasse 70, CH-4147 Aesch (CH).

(74) Anwalt: E. BLUM & CO.; Vorderberg 11, CH-8044  
Zürich (CH).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,

CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,  
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eura-  
sisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,  
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,  
SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu  
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: DNA POLYMORPHISMS IN STEROL REGULATOR ELEMENT BINDING PROTEINS

WO 01/04352 A2 (54) Bezeichnung: DNA-POLYMORPHISMEN IN STEROL-REGULATOR ELEMENT-BINDENDEN PROTEINEN

(57) Abstract: The invention relates to DNA polymorphisms in sterol regulator element binding proteins (SREBP) that are characteristic of a higher risk of genetic diseases in humans such as hypercholesterolaemia. The corresponding polymorphisms, especially the polymorphisms on SREBP-1 and SREBP-2 are frequently observed in Alzheimer patients (SREBP-2). They are also characterized by a specific behavior in the therapy of HIV patients with protease inhibitors and appear to have an influence on the mortality.

(57) Zusammenfassung: Es werden Polymorphismen in Sterol-Regulator Element-Bindenden-Proteinen (SREBP) beschrieben, die charakteristisch für erhöhtes Risiko genetisch bedingter Krankheiten beim Menschen, wie Hypercholesterinämie, sind. Die entsprechenden Polymorphismen, insbesondere Polymorphismen auf SREBP-1 und SREBP-2, zeigen darüber hinaus auch sehr interessante Häufigung bei Alzheimer-Patienten (SREBP-2), spezielles Verhalten bei Therapie mit Protease-Hemmern bei HIV-Patienten sowie einen Einfluss auf die Mortalität.



**Description**

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

5

DNA-Polymorphismen in Sterol-Regulator Element-Bindenden Proteinen

10

Verweis auf entsprechende Anmeldungen

5

Die vorliegende Anmeldung beansprucht die Priorität der Schweizer Anmeldung Nr. 1277/99 vom 9. Juli 1999, deren Offenbarung hier durch Bezugnahme eingeschlossen ist.

15

10

Technisches Gebiet

20

Die vorliegende Erfindung betrifft Polymorphismen, insbesondere Desoxyribonukleinsäuren (DNA oder DNS)-Polymorphismen, in Sterol-Regulator Element-Bindenden Proteinen, insbesondere Protein-1 (SREBP-1) und Protein-2 (SREBP-2), resp. die Verwendung solcher Polymorphismen für die Diagnostik, aber auch für das Wirkstoff-Screening.

25

20

Stand der Technik

30

Epidemiologische Langzeitstudien haben in den letzten Jahrzehnten zahlreiche Faktoren identifiziert, die die Atherosklerose-Entstehung beschleunigen, und damit die Entstehung von Herzinfarkten fördern. Trotz der Vermeidung von Umweltfaktoren und von Verhaltensweisen, die das Atherosklerose-Risiko erhöhen, kann es schon bei jüngeren Erwachsenen zu ausgeprägten atherosklerotischen Veränderungen bis hin zum Herzinfarkt kommen. In solchen Fällen spielen Erbfaktoren eine entscheidende Rolle. Es ist beispielsweise bekannt, dass Defekte von Genen, die im Cholesterinstoffwechsel eine wichtige Rolle spielen, die Medikation mit cholesterinsenkenden Mitteln erfordern. Durch die frühzeitige Erkennung eines genetischen Defekts lassen sich so rechtzeitig Gegenmassnahmen ergreifen.

35

40

45

35

50

55

5 Es ist deshalb sowohl vom diagnostischen als auch vom therapeutischen Standpunkt aus sehr wünschenswert wesentliche genetische Veränderungen erkennen und nachweisen zu können (siehe A. R. Miserez, Die Bedeutung  
10 5 genetischer Faktoren bei der Entstehung des Herzinfarkts, *uni nova*, April 1998, S. 44-52).

Cholesterin ist, neben seiner Eigenschaft als Vorläufer von Steroidhormonen und Gallensäuren, ein essentieller Bestandteil der Zellmembranen, der die Permeabilität der letzteren entscheidend beeinflusst. Menschliche Zellen kontrollieren ihren intrazellulären Cholesteringehalt in engen Grenzen durch die Regulation: der rezeptorvermittelten Aufnahme extrazellulärer, cholesterinenthaltender Lipoproteinpartikel niedriger Dichte (low  
15 density lipoproteins, LDL) und durch die Steuerung der intrazellulären Cholesterinbiosynthese. LDL-Partikel binden sich an den LDL-Rezeptor (LDLR) mittels ihrer Apolipoprotein (Apo) B-Anteile. Die Bindung und die nachfolgende Internalisierung dieser Lipoprotein-Rezeptor-Komplexe kann teilweise oder vollständig unterbrochen sein,  
20 wenn eines der an diesem Prozess beteiligten Proteine defekt ist oder fehlt. Mutationen der Gene, die das Apolipoprotein E (Mutationen führen zu familiärer Dysbetalipoproteinämie (FBL)), das Apolipoprotein B-100 (Mutationen  
25 führen zu familiär-defektivem Apo B (FDB)), sowie den LDL-Rezeptor (Mutationen führen zu familiärer Hypercholesterinämie (FH)) kodieren, resultieren in einer Ansammlung von cholesterinenthaltenden Partikeln im Plasma, was mit einem Anstieg des Risikos für koronare Herzkrankheit  
30 einhergeht. Mit diesen Mutationen können aber in den meisten untersuchten Populationen nur 4.2 bis 7 % der Fälle mit Hypercholesterinämie (definiert als die 10 % der Personen einer Population mit LDLC-Konzentrationen über dem  
45 90ten Perzentil) erklärt werden. Folglich sind die bei der Mehrzahl der betroffenen Personen mit erhöhtem Plasma-LDLC ursächlichen Gendefekten noch nicht identifiziert.

50

55

Die Promotoren des LDLR-Gens sowie der Gene, die in der Cholesterinbiosynthese eine Rolle spielen, wie zum Beispiel die Hydroxymethylglutaryl-(HMG)-CoA-Synthase-, die Farnesyl-Pyrophosphat-Synthase- und die Squalen-Synthase-Gene, enthalten spezifische Nukleotidsequenzen, die sogenannten Sterol-Regulator-Elemente (SRE).

Es ist ebenfalls bereits bekannt, dass zwei Proteine, die SRE-bindenden Proteine SREBP-1 und SREBP-2, an die SRE in den Promotoren dieser Gene binden und deren Transkriptionsrate aktivieren. Bei einem Mangel an Sterolen innerhalb der Zelle werden beide Proteine durch jeweils zwei proteolytische Schritte aktiviert, zunächst durch einen Sterol (bzw. Cholesterol)-sensitiven Schritt und danach durch einen Sterol-unabhängigen Schritt. Durch diese Proteolyseschritte entstehen 68 kDa grosse Proteine aus der NH<sub>2</sub> Region der sich im Zytoplasma befindlichen SREBP-1- und SREBP-2-Vorläuferproteine. Die am Amino-Ende freigesetzte, reife Form der Transkriptionsfaktoren wandert in den Zellkern und bindet sich an die SRE der Promotoren von Cholesterin-regulierenden Genen. In der Folge werden diese Gene aktiviert, was zu einer Erhöhung der rezeptorvermittelten Aufnahme von LDL und zu einer verstärkten intrazellulären Cholesterinbiosynthese führt.

Sobald sich Cholesterin in der Zelle anhäuft, wird der erste, Cholesterin-empfindliche Schritt inhibiert, die reifen Formen der SREBP verschwinden und die Transkriptionsraten vermindern sich, wodurch eine zu grosse Akkumulation von Cholesterin in der Zelle verhindert wird. SREBP-1 und SREBP-2 regulieren zahlreiche SRE-enthaltende Gene, die in die Cholesterin-Homöostase involviert sind, SREBP-1 aktiviert zusätzlich die HMG-CoA-Reduktase und die Squalen-Synthase. SREBP-1 und SREBP-2 sind Mitglieder der sogenannten basischen Helix-Loop-Helix Leucine Zipper Transkriptionsfaktor-Familie. Die Gene, die diese Faktoren kodieren, wurden kürzlich kloniert und in ihrer genetischen Struktur charakterisiert (20, 21).

5                   Trotz all dieser bereits gewonnenen Erkennt-  
nisse liegt aber - wie bereits oben erwähnt - die Zahl  
der erkennbaren Risikopatienten für z.B. Hypercholeste-  
rinämie bei unter 7 %.

10                   5                   Ziel der vorliegenden Erfindung war es des-  
halb, die Frühdiagnose und die Therapie von Risikopatienten  
zu verbessern.

15                   Dieses Ziel wurde dadurch erreicht, dass Dia-  
gnoseverfahren sowie für deren Durchführung geeignete Poly-  
10                   morphismen auf den SREBP-Genen bereitgestellt werden,  
insbesondere Polymorphismen, die bei einem Teil der Pati-  
enten mit Änderungen im Lipidhaushalt, insbesondere im  
20                   Cholesterinhaushalt, vorzugsweise bei einem bedeutenden  
Teil solcher Patienten, auftreten.

15                   Darstellung der Erfindung

25                   Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist  
folglich ein Verfahren zur Erkennung eines erhöhten oder  
20                   erniedrigten Krankheits- und/oder Mortalitätsrisikos  
und/oder einer erhöhten oder erniedrigten Sensitivität  
30                   auf Therapieverfahren resp. deren Nebenwirkungen.

                  Weitere Gegenstände der vorliegenden Erfin-  
dung sind die Verwendung von Polymorphismen zur Diagnose,  
35                   25                   zur Beurteilung von Behandlungen gegen Krankheiten und  
zum Wirkstoffscreening, sowie die Bereitstellung geeigneter  
Polymorphismen.

                  Überraschenderweise wurde gefunden, dass Po-  
40                   lymorphismen auf Sterol-Regulator Element-Bindenden-Pro-  
30                   teinen (SREBP), insbesondere SREBP-1 und SREBP-2, indika-  
toren für Gesundheits- resp. Therapierisiken sind. Das  
erfindungsgemäße Verfahren ist deshalb dadurch gekenn-  
45                   zeichnet, dass nach Blut- resp. Gewebeentnahme, das Blut  
resp. Gewebe auf das Vorhandensein eines Polymorphismus  
35                   in mindestens einem SREBP untersucht wird, wobei das Vor-  
handensein eines Polymorphismus auf Amino- und/oder Nu-  
50                   kleinsäure-Ebene bestimmt werden kann. Der Begriff Poly-



morphismus, wie er im Rahmen dieser Erfindung gebraucht wird, beschreibt jede natürlich im Menschen vorkommende Sequenzvariation, vorzugsweise aber eine Sequenzvariation, die bei einem grossen Bevölkerungsanteil vorkommt.

In einem bevorzugten Verfahren werden entsprechende Nukleinsäuresequenzen, die einen charakteristischen Polymorphismus aufweisen, insbesondere einen Polymorphismus von SREBP-1 und/oder SREBP-2, auf einem DNA- und/oder RNA-Chip verwendet, sog. Microarray (DNA Chip) Technologie. Andere Verfahren sind beispielsweise PCR und darauffolgende Restriktionsenzymverdauung, beispielsweise mit *Msp* I bzw. *Xmn* I; "Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)"-Verfahren; "Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)"-Verfahren; "Protein Truncation Test (PTT)"-Verfahren; "Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP)"-Verfahren; "Cleavage Fragment Length Polymorphisms (CFLP)"-Verfahren; "Chemical Cleavage of Mismatches"-Verfahren; Sequenzierung; Minisequenzierung (Snap-shot-Sequenzierung); auf "High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)" basierende Verfahren (dHPLC); auf Massenspektroskopie basierende Verfahren; Dot blot-Verfahren (allelspezifische Oligonukleotide); allelspezifisches PCR-Verfahren (allelspezifische Oligonukleotide); "Real-Time" quantitative PCR-Spectrophotometrie (z.B. TaqMan™, Light Cycler™); und "Luminescent non-gel based molecular interrogation".

Mit den im Rahmen dieser Erfindung speziell interessierenden Polymorphismen, insbesondere jenen, die auf den SREBP-1 und SREBP-2 Genen gefunden wurden, geht eine geänderte Funktionsfähigkeit der Proteine einher. In Anwesenheit der unten näher beschriebenen Mutationen im SREBP-1- und SREBP-2-Gen beispielsweise wird das LDL-Rezeptorgen weniger oder besser aktiviert, was zu veränderten Cholesterinspiegeln beim Menschen führt.

Ferner wurde im Rahmen der vorliegenden Erfindung gefunden, dass entsprechende Polymorphismen Indikatoren für erhöhtes oder erniedrigtes Krankheitsrisiko

5 sind, insbesondere für erhöhtes resp. erniedrigtes Risiko  
an Hypercholesterinämie oder der Alzheimer-Krankheit zu  
erkranken. Sie ermöglichen auch die Beurteilung des Risi-  
10 kos für das Auftreten von Problemen bei der HIV-Therapie,  
5 insbesondere der Therapie mit Proteasehemmern, und ermög-  
lichen das Abschätzen des Risikos für die Entwicklung ir-  
gendeiner mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko verbunde-  
nen Erkrankung, dies auch unabhängig von einer gegebenen-  
15 falls assoziierten Cholesterinmodifikation oder Alzhei-  
10 mer-Krankheit.

Die Erfindung wird unten und in den Figuren  
näher beschrieben.

#### Kurze Beschreibung der Zeichnungen

15 Figur 1A zeigt ein Chromatogram zur Identifi-  
zierung des Exon-Polymorphismus in SREBP-1, und den er-  
25 mittelten Polymorphismus, nämlich eine Mutation im SREBP-  
1 Gen (Exon 18c) an Aminosäureposition 1028 (G1028G), die  
20 zu keinem Aminosäureaustausch führt, aber eine *Xmn* I Re-  
striktionsschnittstelle generiert.

30 Figur 1B zeigt ein Chromatogram zur Identifi-  
zierung des Exon-Polymorphismus in SREBP-2 und den ermit-  
telten Polymorphismus, nämlich eine Mutation im SREBP-2  
25 Gen (Exon 10) an Aminosäureposition 595 (A595G), die zu  
35 einer Aminosäuresubstitution führt (Alanin zu Glycin) und  
eine zusätzliche *Msp* I Restriktionsschnittstelle gene-  
riert.

40 Figur 2A zeigt, wie mittels PCR Amplifikation  
30 des ganzen Exon 18c (SREBP-1) und darauffolgende Restrik-  
tionsenzymverdauung homozygote und heterozygote Träger  
der entsprechenden Mutation beim Screenen von grossen  
Personenkollektiven mit hohem Durchsatz identifiziert  
45 werden können.

35 Figur 2B zeigt, wie mittels PCR Amplifikation  
des 5'-Endes von Exon 10 (SREBP-2) und darauffolgende Re-  
striktionsenzymverdauung homozygote und heterozygote Trä-  
50

ger der entsprechenden Mutation beim Screenen von grossen  
Personenkollektiven mit hohem Durchsatz identifiziert  
werden können.

Figur 3 zeigt für SREBP-1 und für SREBP-2 den  
Vergleich zwischen Trägern und Nicht-Trägern der Polymor-  
phismen hinsichtlich der entsprechenden, gemittelten Ge-  
samt-Cholesterinkonzentrationen und der Gen-Gen Interak-  
tionen mit dem Apolipoprotein E-Gen.

Figur 4 zeigt die prozentuale Aenderung der  
Plasmacholesterinspiegel vor und nach Gabe von Protease-  
hemmern in Abhängigkeit vom G1028G Polymorphismus.

#### Wege zur Ausführung der Erfindung

Polymorphismen in den SREBP-Genen allgemein  
können, wie unten für die SREBP-1- und SREBP-2-Gene be-  
schrieben, ermittelt werden.

Die speziellen Polymorphismen können z.B. da-  
durch bestimmt werden, dass Oligonukleotide entworfen  
werden, die den Intron-Sequenzen der SREBP-1- und SREBP-  
2-Gene entsprechen, die unmittelbar den Exon-/Intron-  
Grenzen benachbart sind, und dass mittels der Einzel-  
Strang-Konformations-Polymorphismus-Methode (SSCP) beide  
Gene für Sequenzvariationen getestet werden.

Auf diese Weise wurden die folgenden relativ  
häufig auftretenden Polymorphismen gefunden, die jeweils  
dem normalen Gen gegenübergestellt werden, wobei NS die  
Nukleotidsequenz und AS die Aminosäuresequenz bedeuten:

#### **SREBP-1 (Wild-Typ):**

NS G CAC CTA GGC AAA GGC TTC (Seq. Id. Nr. 1)  
AS H L G K G F (Seq. Id. Nr. 2)

#### **SREBP-1-Exon 18c-Polymorphismus (SREBP-1-**

#### **G1028G oder SREBP-1c-G1028G):**

NS G CAC CTA GGC AAA GGC TTC (Seq. Id. Nr. 3)  
AS H L G K G F (Seq. Id. Nr. 4)

5

**SREBP-2 (Wild-Typ):**

NS CT GCT GCC GCC AAC CTA CA (Seq. Id. Nr. 5)  
AS A A A A N L Q (Seq. Id. Nr. 6)

10

5

**SREBP-2-Exon 10-Polymorphismus (SREBP-2-****A595G):**

NS CT GCT GCC GGC AAC CTA CA (Seq. Id. Nr. 7)  
AS A A A G N L Q (Seq. Id. Nr. 8)

15

10

Analog wurde ein zwischenzeitlich im Rahmen einer Diplomarbeit veröffentlichter weiterer SREBP-2-Polymorphismus mit relativ grosser Häufigkeit ermittelt (siehe Diplomarbeit am Departement Forschung, Universitätskliniken Basel, von Patrick Y. Müller, "Sterol Regulatory Element Binding Protein 2: ..."), der in der Folge als SREBP-2-Exon-6-Polymorphismus oder SREBP-2-R371K bezeichnet wird.

25

Eine Gegenüberstellung der Sequenz des Wild-Typs und dieses weiteren Polymorphismus zeigt eine Änderung auf Proteinstufe, nämlich Mutation eines Arginins (R) zu einem Lysin (K) an Position 371 (R371K) in Exon 6, nämlich:

30

**SREBP-2 (Wild-Typ):**

NS CTG AGG AAG  
AS L R K

35

25

**SREBP-2-Exon 6-Polymorphismus (SREBP-2-****R371K):**

NS CTG AAG AAG  
AS L K K

40

30

Wie aus den obigen Sequenzen ersichtlich ist, weist jeder der drei Polymorphismen eine geänderte Nukleinsäure im Exonbereich auf, wobei nur zwei der drei Polymorphismen, nämlich jene zu SREBP-2, eine Mutation aufweisen, die sich auf Proteinebene auswirkt (siehe dazu Figur 1A, Figur 1B). Alle drei Polymorphismen führen je-

45

35

50

55

5 doch zu neuen Schnittstellen für Restriktionsenzyme, nämlich im SREBP-1 zu einer für *Xmn* I und im SREBP-2 zu einer für *Msp* I resp. einer für *Dde* I.

10 Selbstverständlich sind die entsprechenden  
5 Polymorphismen auch in den Komplementärsträngen vorhanden, so dass im Rahmen der vorliegenden Erfindung überall, wo Bezug auf Nukleotidsequenzen gemacht wird, die entsprechende Offenbarung die Komplementärsequenzen einschliesst.

15 Da der Polymorphismus im SREBP-1-Gen nicht zu einer Änderung auf Proteinebene führt aber trotzdem mit dem Auftreten von Hypercholesterinämie korrelierbar ist, drängt sich der Schluss auf, dass dieser Polymorphismus mit einer oder mehreren Mutationen im selben Gen einhergeht oder einen Einfluss auf der RNA-Ebene ausübt. Diese  
20 Annahme steht im Einklang mit der Tatsache, dass für den in SREBP-1 gefundenen Polymorphismus nicht nur ein Zusammenhang mit dem Auftreten von Hypercholesterinämie gefunden wird, sondern gleichzeitig ein Zusammenhang mit einem  
25 Mangel an Erhöhung der Gesamtcholesterin- und Triglycerid-Konzentration in HIV-Patienten nach der Verabreichung von Protease-Inhibitoren festgestellt wird. Dieser Polymorphismus ist deshalb ein wertvolles Hilfsmittel bei der Risikoabschätzung des Auftretens von unerwünschten Wirkungen und Einstellung einer Behandlung mit Protease-Hemmern.

30 Eine andere wichtige Eigenschaft der vorliegend beschriebenen Polymorphismen, insbesondere des SREBP-2-A595G-Polymorphismus, ist dessen Vorherrschen bei  
40 Patienten mit der Alzheimer-Krankheit im Vergleich zu dessen Vorkommen in der Bevölkerung allgemein, nämlich 7 % bei Alzheimer Patienten gegenüber 2.4 % in der Bevölkerung allgemein.

45 Überraschenderweise wurde zudem gefunden,  
35 dass alle drei oben näher beschriebenen Polymorphismen signifikanten Einfluss auf die Mortalität ihres Trägers haben.

5 Zusammenfassend kann somit festgehalten werden, dass SREBP-2-A595G speziell geeignet ist um Aussagen  
über das Risiko für Cholesterinerhöhung an und für sich  
zu machen, währenddem SREBP-1c-G1028G insbesondere geeig-  
10 net ist als prognostischer Marker für die individuelle  
Reaktion (Risiko der Cholesterinerhöhung) nach Gabe von  
Medikamenten. Für Aussagen über das Risiko für die Ent-  
wicklung der Alzheimer-Krankheit (auch unabhängig von ei-  
15 ner gegebenenfalls assoziierten Cholesterinerhöhung oder  
-erniedrigung) ist SREBP-2-A595G bevorzugt, während für  
20 die Bestimmung des Risikos für die Entwicklung einer Er-  
krankung, die mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko ver-  
bunden ist (auch unabhängig von einer gegebenenfalls as-  
soziierten Cholesterinmodifikation oder Alzheimer-Krank-  
15 heit) alle drei oben näher beschriebenen Polymorphismen  
geeignet sind, wobei SREBP-2-A595G und SREBP-1c-G1028G  
bevorzugt sind.

25 Während allgemein für das Verfahren Polymor-  
phismen der SREBP geeignet sind, sind solche von SREBP-1  
20 und/oder SREBP-2 bevorzugt, insbesondere aber Polymor-  
phismen, die zu einer erhöhten oder erniedrigten Aktivie-  
30 rung von Genen im Lipidstoffwechsel, insbesondere im Cho-  
lesterinstoffwechsel führen. Dabei sind Polymorphismen,  
die zu erhöhter oder erniedrigter Plasmakonzentration  
25 mindestens eines Lipids, insbesondere von Cholesterin,  
35 führen weiter bevorzugt.

Es hat sich gezeigt, dass ein Polymorphismus,  
der eine Erkennungssequenz für eine innerhalb des Poly-  
morphismus liegende Schnittstelle aufweist, sich speziell  
40 für ein Verfahren unter Verwendung dieser Erkennungsse-  
30 quenz eignet. Solche Erkennungssequenzen sind beispiels-  
weise die Erkennungssequenz für Xmn I oder Msp I, d.h.  
45 GAANNNTTC oder CCGG, wobei N ein beliebiges Nukleotid  
sein kann. Sequenzen, die solche Erkennungssequenzen ent-  
35 halten sind beispielsweise

SREBP-1, Exon 18c:GCACCTAGGGAAAGGCTTC, (Seq.  
Id. Nr. 3) und

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55

5 SREBP-2, Exon 10: CTGCTGCCGGCAACCTACA (Seq. Id. Nr. 7).

10 Diese Sequenzen können als solche oder zusammen mit weiteren Nukleotiden aus ihrer natürlichen Nachbarschaft als z.B. Sonde eingesetzt werden. Daneben gibt es aber auch weitere geeignete Sequenzen, wie die folgende Nukleinsäure-Sequenz, gegebenenfalls zusammen mit weiteren Nukleotiden aus der natürlichen Nachbarschaft dieser Sequenz, nämlich

15 SREBP-2, Exon 6: CTGAAGAAG.

20 Ein bevorzugtes Verfahren auf Ebene der Nukleinsäuren ist dadurch gekennzeichnet, dass nach Blut- resp. Gewebeentnahme und DNA-Extraktion mindestens ein Teilstück einer Sequenz, insbesondere eines Exons, eines SREBP, das einen Polymorphismus enthält, unter Verwendung zweier Oligonukleotidsequenzen amplifiziert wird, wobei der Polymorphismus charakteristisch ist für eine erhöhte oder erniedrigte Aktivierung von Genen im Lipidstoffwechsel insbesondere im Cholesterinstoffwechsel, und speziell

25 bevorzugt für erhöhtes oder erniedrigtes Risiko für Hypercholesterinämie beim Menschen, und dass das Produkt der Amplifikation einer Verdauung mit geeigneten Restriktionsenzymen oder einer Denaturierung unterworfen wird und dass die Verdauungs- resp. Denaturierungsprodukte

30 elektrophoretisch aufgetrennt werden.

35 Falls der Polymorphismus in einem Exon liegt ist vorzugsweise mindestens eine der Oligonukleotidsequenzen im Intronbereich angesiedelt, der dem Exon benachbart ist, in dem der Polymorphismus existiert, wie

40 beispielsweise die Paare

S1.13cF (Seq. Id. Nr. 9):

5'-TTATTTATAATCTGGGTTTGTGTC-3' und

S1.18cR (Seq. Id. Nr. 10):

45 5'-GGGAAGAGCTAAGTTAAAAGTTGTG-3' oder

35 EcoR I.S1.18cF (Seq. Id. Nr. 11):

5'-CGGAATTCTGAAATTATTTATAATCTGGGTTTGTGTC-3' und

50

55

5

*EcoR* I.S1.18cR (Seq. Id. Nr. 12):

5'-CGGAATTCATCGGGGAAGAGCTAAGTTAAAAGTTGTG-3' oder

S2.10P.F (Seq. Id. Nr. 13):

5'-GCCAGTGACCATTAACACCTTTTGA-3' und

10

5

S2.10P.R. (Seq. Id. Nr. 14):

5'-TCGTCTTCAAAGCCTGCCTCAGTGGCTGGC-3' oder

*EcoRI* S2.10F (Seq. Id. Nr. 15):

5'-CGGAATTCGCCAGTGACCATTAACACCTTTTGA-3' und

15

*EcoRI* S2.10R (Seq. Id. Nr. 16):

10 5'-CGGAATTCTGCAGCAAGCCAGTCATCAGCAGCT-3'

*EcoRI* S2.6F (Seq. Id. Nr. 17):

5'-CGGAATTCTGGTCTCACTGTGTTTCACTCATC-3'

20

*EcoRI* S2.6R (Seq. Id. Nr. 18):

5'-CGGAATTCGCCAGGGCTGACAAGCCTTTTCTCA-3'.

15

Neben den oben angegebenen Sequenzen resp. Sequenzpaaren sind auch andere Sequenzen resp. Sequenzpaare verwendbar, wie mit den oben angegebenen Sequenzen unter stringenten Bedingungen hybridisierbare Sequenzen, einschliesslich Sequenzen ohne resp. mit anderen Erkennungssequenzen als der oben angegebenen *EcoRI*-Sequenz. Die Gesamtlänge solcher Sequenzen beträgt üblicherweise 15 bis 30 Basen.

30

Geeignete Polymorphismen können ermittelt werden durch amplifizieren und analysieren einer interessierenden SREBP-Sequenz, Vergleich der Exon-Bereiche dieser interessierenden Sequenz mit den Exon-Bereichen der Sequenz des in einer Population am häufigsten auftretenden Typs des entsprechenden SREBP und Untersuchung der Sequenzen mit gefundenen Unterschieden auf Fehlfunktion, wobei vorzugsweise die Unterschiede zu einer anderen Aminosäure und/oder insbesondere zu einer Erkennungsstelle für ein Restriktionsenzym führen. Eine solche Erkennungsstelle liegt vorzugsweise in einem Exon, sie kann aber auch in einem Intron liegen und beispielsweise zu einer Spleissvariante führen.

35

40

30

45

35

Der grosse Einfluss der gefundenen Polymorphismen auf Krankheitsbilder beeinflussende Faktoren wird

50

55



5 in der Folge kurz anhand der häufiger auftretenden Polymorphismen A595G und G1028G diskutiert:

Die A595G Mutation im SREBP-2 Gen ist mit einer signifikanten Modifikation der gemittelten Plasmacholesterin-Konzentrationen assoziiert. Die der publizierten cDNA Sequenz (12,15,16) entsprechende Aminosäurefolge wurde als Wildtyp definiert, obgleich - zumindest in dem vorliegend untersuchten Schweizer Bevölkerungskollektiv - die Sequenz, die Glycin an Position 595 kodiert, eine viel höhere Prävalenz hatte als das publizierte Alanin an dieser Stelle. Ueber 93% aller Individuen waren heterozygote oder homozygote Träger der A595G Mutation. Beide Gene wurden aus einer cDNA-Bibliothek, abgeleitet von HeLa Zellen, die vom Karzinom einer afro-amerikanischen Frau (Henriette Lacks) abstammen, sequenziert (17). Direkte Versuche mit HeLa Zellen zeigten Homozygotie hinsichtlich des nicht mutierten A595A Genotyps und legten die Annahme nahe, dass diese Person homozygote Trägerin des Wildtyp Allels war - ein Zustand, der jedoch nur bei 6.69% des schweizerischen Bevölkerungskollektivs vorgefunden wurde. Die Beobachtung einer hohen Prävalenz der A595G Mutation, führte im Rahmen der vorliegenden Erfindung zur Annahme, dass der seltene Wildtyp in homozygoter Form (11) mit einer höheren Plasmacholesterinkonzentration assoziiert sei, und die nicht mutierte Form (22) mit einer niedrigeren Konzentration, dass somit ein autosomal-rezessiver Effekt vorliegen könnte, weshalb die Allelkombinationen 11 und 12/22 miteinander verglichen wurden.

Das Kollektiv der eingeschlossenen Individuen war heterogen hinsichtlich der Plasmagesamtcholesterinkonzentrationen, die von 1.95 bis 22.65 mmol/L reichten. Dieser grosse Bereich erklärte sich durch den Einschluss von zufälligen Stichproben, aber auch ausgewählten Kollektiven, und folglich normocholesterinämischen und hypercholesterinämischen Individuen. Daher war es nicht verwunderlich, dass ohne Stratifizierung des Kollektivs in zufällig/nicht zufällig ausgewählte oder in normocho-

5 lesterinämische/hypercholesterinämische Untergruppen, der  
Effekt zumindest eines der Polymorphismen, der des G1028G  
Polymorphismus, keine statistische Signifikanz erreichte  
10 ( $P=0.0770$ ). Sobald jedoch diese Auswahlkriterien in die  
5 Berechnungen einbezogen wurden, war der Unterschied der  
G1028G Allelkombinationen 11/12 gegenüber 22 signifikant  
( $P=0.0164$ ). Ebenso verringerte sich bei der A595G Muta-  
tion die Wahrscheinlichkeit, dass Unterschiede in den  
15 Plasmagesamtcholesterinkonzentrationen zwischen der Al-  
10 lelkombination 11 gegenüber 12/22 auf Zufall beruhten,  
von  $P=0.0003$  (ungepaarter t-Test, keine Stratifizierung)  
auf  $P<0.0001$  (Varianzanalyse = ANOVA, Stratifizierung).

20 Darüberhinaus waren bei beiden Polymorphismen  
die Assoziationen zwischen einer bestimmten Allelkombina-  
15 tion und höheren Plasmacholesterin-Konzentrationen (Al-  
lelkombination 22 beim G1028G Polymorphismus, Allelkombi-  
25 nation 11 beim A595G Polymorphismus; in Figur 3, E und F,  
schwarz dargestellt) in Anwesenheit des R158C ( $\epsilon 2$  Phäno-  
typ) Polymorphismus stärker und in Abwesenheit des C112R  
20 ( $\epsilon 4$  Phänotyp) Polymorphismus im Apo E Gen schwächer. Es  
wurde gefunden, dass diese Gen-Gen Interaktionen die Asso-  
30 ziation des G1028G Polymorphismus (22 Allelkombination)  
mit höheren Plasmacholesterinkonzentrationen deutlich be-  
einflussen: nach Ausschluss der Träger der C112R Mutation  
25 war der Effekt der G1028G C  $\rightarrow$  G Mutation in homozygoter  
Form (22) hoch signifikant ( $P=0.0002$ ).

Es konnte somit gezeigt werden, dass beide  
SREBP-Gene die Plasmacholesterin-Konzentrationen beim  
40 Menschen ähnlich den bekannten Effekten der beiden Poly-  
30 morphismen im Apo E Gen (C112R und R158C), modifizieren.  
Desweiteren wurden Gen-Gen Interaktionen deutlich, wenn  
die SREBP-1 und -2 Genpolymorphismen mit den Polymorphis-  
men im Apo E Gen korreliert wurden.

45 Bei 11.6% der Individuen mit sekundären Hy-  
35 perlipoproteinämien waren die Plasma-triglyceridkonzen-  
trationen erhöht. Ein Effekt erhöhter Triglyceridkonzen-  
trationen wird durch die Tatsache unterstrichen, dass,  
50

5 wurden Individuen mit erhöhten Triglyceridkonzentrationen  
ausgeschlossen, die A595G Mutation eine signifikante Aus-  
wirkung auf männliche Individuen mit Diabetes mellitus  
zeigte ( $P=0.0018$ ), dieser Effekt jedoch ausblieb, wenn  
10 5 Individuen mit erhöhten Triglyceridkonzentrationen einge-  
schlossen wurden.

Die A595G Mutation im SREBP-2 Gen könnte so-  
wohl eng mit einer anderen Mutation verbunden sein als  
15 auch die Spaltungsrate des Proteins direkt betreffen.

10 Exon 10, wo die A595G Mutation lokalisiert ist, gehört  
zwar nicht zum Teil des reifen Proteins, das in den Zell-  
kern wandert. Trotzdem ist dieser Teil des Proteins inso-  
fern mit der Aktivität des Proteins verbunden, als er die  
20 Spaltungsvorgänge, die die SREBP-2 Vorläuferform aktivie-  
ren, beeinflusst.  
15

Die Proteolyse wird durch ein Enzym eingelei-  
25 tet, das eine hoch konservierte RXXL Sequenz der SREBP  
Vorläuferformen erkennt, welche in der hydrophilen  
Schleife lokalisiert ist. Durch einen ersten Proteolyse-  
20 schritt werden die  $\text{NH}_2$ -Terminus- und die  $\text{COOH}$ -Terminus-  
Domänen getrennt. Nach diesem ersten, Sterol-sensitiven  
30 Schritt wird das verbleibende, Membran-gebundene  $\text{NH}_2$ -Ter-  
minus Fragment durch einen zweiten, Sterol-unabhängigen  
Schritt freigesetzt. Der zweite Proteolyseschnitt (site-  
35 2) ist innerhalb der Membran-durchspannenden Region lo-  
kalisiert und wird durch das site-2 Enzym vermittelt. Der  
zweite Schritt erfolgt nur, wenn die site-1 Proteolyse  
stattgefunden hat. Eine Vorbedingung für die site-1 Pro-  
teolyse ist jedoch die Bildung eines Komplexes aus SREBP  
40 und dem sogenannten SREBP Cleavage Activating Protein  
(SCAP). Bei Mangel von Sterolen in der Zelle bindet die-  
ses Protein an die  $\text{COOH}$ -Terminus Domäne. Die Bildung des  
SREBP-SCAP Komplexes ist entscheidend für den site-1 Pro-  
teolyseschritt und abhängig von der Vollständigkeit der  
45  $\text{COOH}$ -Terminus Domänen von SREBP-2 und SCAP (18,19). Auf  
35 der Grundlage der vor kurzem von Sakai et al. (18) durch-  
geführten Experimente, der den  $\text{COOH}$ -Terminus Teil der  
50

5 SREBP Vorläuferformen als regulatorische Einheit identi-  
fizierte, wirft die Mutation in dieser Domäne, die ein  
signifikantes Sinken der gemittelten Plasmacholesterin-  
Konzentrationen verursacht, die Frage einer leicht ver-  
10 5 einfachten Bildung des SREBP-SCAP Komplexes auf, wenn die  
A595G Mutation vorhanden ist.

Der Effekt des G1028G Polymorphismus scheint  
von den Gen-Gen Interaktionen mit dem Apo E Gen beein-  
15 flusst zu sein. Im Gegensatz zur G1028G Mutation im  
10 SREBP-1 Gen, hat die A595G Mutation im SREBP-2 Gen als  
Marker signifikante Auswirkungen auf die Plasmacholeste-  
rin-Konzentrationen sowohl wenn das gesamte Kollektiv un-  
tersucht wird, als auch bei der Analyse der verschiedenen  
20 Untergruppen. Es ist wahrscheinlich, dass die Mutation  
15 ihre Wirkung zeigt, indem sie direkt den Spaltungsvorgang  
beeinflusst, der für die Sterol-abhängige Aktivierung von  
SREBP-2 verantwortlich ist.

25 Aus den obigen Ausführungen folgt, dass beide  
Gene die individuellen Plasmacholesterin-Konzentrationen  
20 signifikant modifizieren. Obgleich viele Gene im intra-  
und extrazellulären Cholesterinstoffwechsel eine Rolle  
30 spielen, ist im Hinblick auf die Allgemeinbevölkerung  
bislang nur das Apo E Gen als modifizierendes Gen von  
grösserem Nutzen gewesen. Andere am Lipoproteinmetabolis-  
25 mus beteiligte Gene, wie etwa das LDL Rezeptorgen, das  
Apo B-100 Gen oder ein weiteres, unbekanntes Gen auf  
Chromosom 1p34.1-p32 könnten im mutierten Zustand deutli-  
che Auswirkungen auf die Plasmagesamtcholesterinkonzen-  
35 trationen haben. Jedoch sind diese Mutationen im Ver-  
gleich zu den Polymorphismen im Apo E- und den jetzt ent-  
30 deckten Polymorphismen im SREBP-1 und SREBP-2 - Gen sehr  
selten. Selbst die R3'500Q Mutation, die mit einem von  
209 betroffenen Individuen der Allgemeinbevölkerung (in  
45 der Schweiz) die höchste bisher beobachtete Prävalenz hat  
35 (2), tritt nicht häufig genug auf, um an diesem Polymor-  
phismus den Einfluss eines bestimmten Gens auf den Chole-

50

55

5 sterin-stoffwechsel der Allgemeinbevölkerung zu untersuchen.

Die Verfahren und Polymorphismen der vorliegenden Erfindung sind somit sehr wertvolle Hilfsmittel  
10 für die Früherkennung von Risikopatienten sowie für die Optimierung von Prophylaxe und Therapien. Ferner eignen sie sich als Targets für das Wirkstoffscreening, sowie die Beurteilung einer Therapie gegen eine Krankheit wie  
15 z.B. HIV. Der Wert der bevorzugten Polymorphismen dieser Erfindung ist auch die Anwesenheit von Erkennungssequenzen in nächster Nähe des Polymorphismus. Diese Erkennungssequenzen sind in SREBP-1 die Erkennungssequenz für  
20 Xmn I, nämlich GAANNNTTC, wobei N ein beliebiges Nukleotid sein kann, und in SREBP-2 die Erkennungssequenz  
15 für Msp I, d.h. CCGG.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Erfassung von Risikoträgern sowie Hilfsmittel für dieses Verfahren, wie Oligonukleotid-Sequenzen zur Amplifizierung interessierender DNA-Abschnitte.

20 Ein bevorzugtes Verfahren zur Erfassung von Risikoträgern zeichnet sich aus durch die nachfolgend  
30 aufgeführten Schritte:

1. Blut- oder Gewebeentnahme
2. DNA-Extraktion
- 35 25 3. Amplifikation mit geeignetem Primer
4. Verdauung mit geeigneten Restriktionsenzymen oder Denaturierung des PCR-Produktes
- 40 30 5. Elektrophoretische Auftrennung auf geeignetem Gel.

Über die Verdauung mit geeigneten Restriktionsenzymen werden insbesondere die speziell interessierenden Polymorphismen nachgewiesen und über die Denaturierung (Einzel-Strang-Konformations-Polymorphismus = SSCP)  
35 lassen sich daneben weitere Mutationen auffinden.

50

55

5 Eine bevorzugte Oligonukleotid-Sequenz zur  
Amplifizierung eines DNA-Abschnitts, der einem Exon-Bereich entspricht, in dem ein Polymorphismus existiert,  
ist dadurch gekennzeichnet, dass sie in einem Intronbereich angesiedelt ist, der dem Exon benachbart ist, in  
10 dem der Polymorphismus existiert und nahe der Exon/Intron Grenze liegt, oder im Exon selbst, sofern sich dadurch die Zahl der Schnittstellen vermindern lässt.

15 Bevorzugte Oligonukleotide für den SREBP-1  
Polymorphismus sind die Oligonukleotide S1.18cF (Seq. Id. Nr. 9): 5'-TTATTATAATCTGGGTTTGTGTC-3' und S1.18cR (Seq. Id. Nr. 10): 5'-GGGAAGAGCTAAGTTAAAAGTTGTG-3', die auch die Erfassung von Spleiss-Mutationen gestatten, sowie Oligonukleotiden, die daneben zusätzliche EcoR I-Schnittstellen besitzen, wie EcoR I.S1.18cF (Seq. Id. Nr. 11): 5'-CGGAATTCTGAAATTATTTATAATCTGGGTTTGTGTC-3' und EcoR I.S1.18cR (Seq. Id. Nr. 12): 5'-CGGAATTCATCGGGGAAGAGCTAAGTTAAAAGTTGTG-3'. Um Exon 10 des SREBP-2-Gens inklusive dessen Exon-/Intron-Grenzen zu amplifizieren sind  
20 die Oligonukleotide S2.10P.F (Seq. Id. Nr. 13): 5'-GCCAGTGACCATTAAACACCTTTTGA-3' und S2.10P.R (Seq. Id. Nr. 14): 5'-TCGTCTTCAAAGCCTGCCTCAGTGGCTGGC-3' resp. EcoRI S2.10F (Seq. Id. Nr. 15): 5'-CGGAATTCGCCAGTGACCATTAAACACCTTTTGA-3' und EcoRI S2.10R (Seq. Id. Nr. 16): 5'-CGGAATTCTGCAGCAAGCCAGTCATCAGCAGCT-3' bevorzugt.

35 Eine spezielle Verwendung von SREBP- Polymorphismen betrifft deren Einsatz auf sogenannten DNA- oder Gen-Chips. Verfahren unter Verwendung solcher Chips, die die gleichzeitige Erkennung verschiedener Gendefekte ermöglichen, sind in der Literatur beschrieben. So existiert Informationsmaterial der Firma Affymetrix zu deren GeneChip™ -Systemen, aber auch Artikel in Fachzeitschriften wie jene von Mark Chee et al., *Accessing Genetic Information with High-Density DNA Arrays*, Science Vol. 274, Seiten 610-4, (1996) und David G. Wang, *Large-Scale Identification, Mapping, and Genotyping of Single-Nucleotide*

5           *Polymorphisms in the Human Genome*, Science Vol. 280, Seiten 1077-82, (1998).

          Das Verfahren lässt sich kurz wie folgt zusammenfassen: Mittels Photolithographie werden gezielte  
10           5 Bereiche eines Wafers Schritt für Schritt der chemischen DNA- oder RNA-Einzelstrang-Synthese zugeführt, wobei der Schutzfilm nach jedem Syntheseschritt neu angebracht und anschliessend selektiv nur an denjenigen Stellen entfernt wird, an denen ein bestimmtes Nukleotid eingeführt werden soll. Durch dieses Vorgehen lassen sich Bereiche herstellen, die selektiv für bestimmte Polymorphismen sind. Zur Sichtbarmachung von Hybridisierungen mit Zielsequenzen  
15           10 können übliche Markierungen verwendet werden, z.B. licht-emittierende Markierung der in der Probe vorhandenen  
20           15 Fragmente, wie z.B. Biotinylierung und Detektion mit Streptavidin oder auch Fluoreszenzmarkierung.

          Durch Entfernen markierter, nicht hybridisierender Fragmente werden Hybridisierungen auf dem Chip direkt oder nach einer weiteren Behandlung sichtbar.  
25           20 Selbstverständlich können die einzelnen Schritte dieses Verfahrens variiert werden, z.B. was den Zeitpunkt der Markierung oder die Art der Markierung anbelangt. Solche Variationen sind für den Fachmann erkennbar.

          Ein Chip, der für die Früherkennung von Patienten mit einem erhöhten Risiko an Hypercholesterinämie  
35           25 geeignet ist weist neben den normalen SREBP-1- und SREBP-2-Sequenzen die entsprechenden Polymorphismen auf, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind. Neben diesen SREBP-1- und SREBP-2-Analysemitteln können selbstverständlich auch entsprechende Sequenzen für die weiteren  
40           30 Polymorphismen vorhanden sein, die für Hypercholesterinämie charakteristisch sind, d.h. FH, FDB und FDL.

          Selbstverständlich kann ein entsprechender  
45           40 Chip auch zur Diagnose anderer Krankheiten bestimmt werden, die eine Abhängigkeit von SREBP-1 und/oder -2 zeigen, wie Alzheimer-Krankheit, oder er kann zur gleichzeitigen Diagnose mehrerer Krankheiten oder Risikofakto-  
50           55

ren gestaltet werden, indem darauf für die interessierenden Krankheiten oder Risiken charakteristische Polymorphismen angebracht werden. Diesbezüglich interessante Sequenzen sind beispielsweise für das Studium kardiovaskulärer Risiken Sequenzen aus der folgenden Gruppe (bevorzugte Sequenzen unterstrichen):

11 $\beta$ -Hydroxylase Aldosteron-Synthase Gen, 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (HSD11K) Gen, 17 $\alpha$ -Hydroxylase (CYP17A) Gen, 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl (HMG) Coenzym A Reduktase Gen, 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl (HMG) Coenzym A Synthase Gen, Acyl Coenzym A:diacylglycerol acyltransferase Gen, Acyl-Coenzym A:cholesterol acyltransferase (ACAT)-1 Gen, Alpha-1-Antichymotrypsin Gen, Alpha-1-trypsin Gen, Alpha-Glaktosidase A Gen, Alpha-L-Iduronidase (IDUA) Gen, Alpha-Lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) Gen, Alpha-Synuclein Gen, Angiotensin Gen, Angiotensin II Typ 1 Rezeptor Gen, Angiotensin-converting Enzym Gen, Antitrypsin Gen, Apolipoprotein (a) Gen, Apolipoprotein AI-CIII-AIV Gen cluster, Apolipoprotein B-100 Gen, Apolipoprotein CI Gen, Apolipoprotein E (epsilon 2), Apolipoprotein E (epsilon 4), Apolipoprotein E Gen, Apolipoprotein E Rezeptor 2 Gen, Benzodiazepine Rezeptor Gen, CD-36 Gen, Cholesterol 24-Hydroxylase Gen, Cholesteryl ester transfer Protein (CETP) Gen, Cystathionin- $\beta$ -Synthase Gen, Cystatin C Gen, Cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage Enzym Gen, Epithelialer Na<sup>+</sup>-Kanal ( $\beta$ -Untereinheit) Gen, Farnesyl-Pyrophosphate (PP) Synthase Gen, Fibrinogen Gen, Glucokinase Gen, GLUT1 Glukose Transporter Gen, Hepatische Lipase Gen, High density lipoprotein (HDL) Rezeptor Gen, Homogentisinsäure-Oxidase Gen, Hormone-sensitive Lipase Gen, Iduronat-2-Sulfatase Gen, Interleukin-8 Gen, Lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) Gen, Lipoxygenase Gen, Lipoprotein Lipase Gen, Low density lipoprotein receptor-related Protein (LRP) Gen, Low density lipoprotein Rezeptor Gen, Lysosomale saure Lipase Gen, Makrophagen Scavenger Rezeptor (SR-A) Gen, Makrophagen Scavenger Rezeptor (SR-BI) Gen,



Methylene-tetrahydrofolate Reduktase Gen, Microsomal triglyceride transfer Protein (MTP) Gen, NF- $\kappa$ B Gen, Niemann-Pick C1 Protein Gen, Oxysterol binding Protein (OSBP) Gen, Paraoxonase-1 Gen, Paraoxonase-2 Gen, Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha Gen, Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) beta Gen, Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma Gen, Plasminogen activator-inhibitor-1 Gen, Site-1 Protein (S1P) Gen, Site-2 Protein (S2P) Gen, Squalene Synthase Gen, SREBP cleavage-activating Protein (SCAP) Gen, Steroid acute regulatory Protein (StAR) Gen, Steroid-11 $\beta$ -Hydroxylase (CYP11B1) Gen, Sterol-27-Hydroxylase Gen, Sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1a Gen, Sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1c Gen, Sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-2 Gen, Very low density lipoprotein (VLDL) Rezeptor Gen.

Für das Studium neurologischer Risiken ist beispielsweise ein Chip umfassend Sequenzen aus der nachfolgend aufgeführten Gruppe günstig (bevorzugte Sequenzen unterstrichen):

A-beta precursor Gen, Adenosin monophosphate deaminase Gen, Alpha 2-monoglobulin Gen, Alpha-1-Antichymotrypsin Gen, Alpha-1-trypsin Gen, Alpha-2 Macroglobulin Gen, Alpha-ketoglyterate dehydrogenase Gen, Amyloid beta-protein precursor Gen, Amyloid precursor Protein Gen, Amyloid precursor-like Protein 1 Gen, Amyloid precursor-like Protein 2 Gen, Antitrypsin Gen, Apolipoprotein (a) Gen, Apolipoprotein AI-CIII-AIV Gen cluster, Apolipoprotein E (epsilon 2), Apolipoprotein E (epsilon 4), Apolipoprotein E Gen, Apolipoprotein E Rezeptor 2 Gen, Bcl-2 Gen, Beta-amyloid precursor Protein Gen, Beta-nerve growth factor Gen, Calbindin-D Gen, Captase Gen, Cathepsin D Gen, CD36 Gen, Clusterin Gen, Cyclooxygenase-2 Gen, Cystatin C Gen, Cytochrome C Oxidase 1 Gen, Cytochrome C Oxidase 2 Gen, Cytochrome Oxidase Gen, Dihydrofolate Reduktase Gen, Dihydrolipoylsuccinyltransferase (DLST) Gen, Endopeptidase 1 Gen, Estrogen-Bcl xL Gen, Fe65L2 Gen,

5           Gamma-synuclein Gen, Gelsolin Gen, GLUT1 Glukose Trans-  
porter Gen, GLUT4 Glukose Transporter Gen, Glutaminsäure  
Decarboxylase Gen, Glutation S-transferase Gen, HLA-A2  
10           Gen, Interleukin-1 Gen, Interleukin-6 Gen, Interleukin-8  
5           Gen, L-3-Hydroxyacyl-Coenzym A Dehydrogenase Gen, Li-  
pooxygenase Gen, Low density lipoprotein receptor-related  
Protein (LRP) Gen, Low density lipoprotein Rezeptor Gen,  
15           Makrophagen Scavenger Rezeptor (SR-A) Gen, Makrophagen  
Scavenger Rezeptor (SR-BI) Gen, Methylene-tetrahydrofo-  
10           late Reduktase Gen, Myeloperoxidase Gen, NF- $\kappa$ B Gen, Nie-  
mann-Pick C1 Protein Gen, Non-A-beta component for amy-  
20           loid (NAC) peptide Gen, Notch Gen, Ornithine transcar-  
bamylase Gen, Presenilin 1 Gen, Presenilin 2 Gen, Prion  
Protein Gen (PRNP) Gen, Prostaglandin E2 Gen, Serotonin  
15           Gen, Serotonin Transporter Gen, Site-1 Protein (SlP) Gen,  
Site-2 Protein (S2P) Gen, SREBP cleavage-activating Pro-  
25           tein (SCAP) Gen, Sterol regulatory element-binding pro-  
tein (SREBP)-1a Gen, Sterol regulatory element-binding  
protein (SREBP)-1c Gen, Sterol regulatory element-binding  
20           protein (SREBP)-2 Gen, Superoxid dismutase gene Gen, Tau  
(Protein) Gen, Very low density lipoprotein (VLDL) Rezep-  
30           tor Gen, Xllalpha Protein Gen, XllL2 Gen.

          Ferner sind die Polymorphismen, Verfahren und  
35           Chips der vorliegenden Erfindung auch geeignet um alfäl-  
25           lige Risikopatienten für die Behandlung mit speziellen  
Medikamenten zu ermitteln, wie eine Behandlung mit Pro-  
tease-Hemmern bei HIV-Infizierten.

          Die vorliegende Erfindung wird nun anhand von  
40           Beispielen näher erläutert. Die Erfindung ist aber nicht  
30           auf die im experimentellen Teil beschriebenen Beispiele,  
resp. die darin explizit genannten Ausführungsformen, be-  
schränkt.

5

**Experimenteller Teil****Vorbemerkungen**

10

5 Die Polymorphismen wurden ermittelt, indem  
Oligonukleotide zu Intronsequenzen im Exon/Intron-Grenz-  
bereich synthetisiert wurden, so dass auch allfällige  
Spleissvarianten erfasst werden konnten. In der Folge  
15 wird das genaue Vorgehen bei der Detektion der vorliegend  
10 relevanten Polymorphismen sowie deren Untersuchung im De-  
tail beschrieben.

20

**Probanden**

25

30

35

40

45

50

15 Es wurden insgesamt 3'078 Personen in die  
Studie aufgenommen. DNA Polymorphismen und seltene Muta-  
tionen in fünf verschiedenen Genen wurden untersucht. In  
allen Personengruppen wurden Individuen mit TC Plasmakon-  
zentrationen unter der 90. Percentile, standardisiert für  
20 Alter und Geschlecht, als normocholesterinämisch (NC) be-  
zeichnet; Individuen mit TC Plasmakonzentrationen über  
der 90. Percentile als hypercholesterinämisch (HC). 1'685  
Probanden aus verschiedenen prospektiv untersuchten Zu-  
fallstichproben wurden eingeschlossen. 630 Individuen  
25 waren aus der "Swiss PREvalence for Apolipoprotein De-  
fects" (SPREAD) Studie, einer grossen Querschnittsunter-  
suchung, die unverwandte, männliche Individuen aus den  
deutsch-, französisch- und romanischsprachigen Teilen der  
Schweiz einschloss, die für den Militärdienst rekrutiert  
30 wurden. Weitere 324 Individuen wurden von der Interdiszi-  
plinären Altersstudie (IDA) eingeschlossen. Weitere 413  
ältere Individuen wurden eingeschlossen, die aufgrund ei-  
ner vermuteten Beeinträchtigung der Gedächtnisfunktion  
45 untersucht wurden, aber nicht aufgrund einer Hyperchole-  
sterinämie. Diese Individuen aus der Basler Memory Clinic  
35 (BMC) wurden als weiteres Kontrollkollektiv in die Studie  
aufgenommen. 318 betroffene und/oder nicht betroffene In-

55

5 dividuen wurden von der "Study to Investigate the Molecu-  
lar Basis of Hypercholesterolemia in Switzerland in Hy-  
perlipidemic Individuals by Pedigree Analysis" (SIBSHIP),  
einer Unterstudie des schweizerischen MED PED (Make Early  
10 5 Diagnosis - Prevent Early Death)-Programms, eine multina-  
tionalen Studie unter der Schirmherrschaft der WHO, in  
die Studie aufgenommen. 871 Individuen wurden von Kollektiven mit vermuteten primären und sekundären Hyperlipoproteinämien eingeschlossen. Die molekulare Diagnose be-  
15 ruhte auf der Identifikation der zugrundeliegenden Mutation (familiär-defektives Apo B (FDB), familiäre Dysbetalipoproteinämie (FDL), familiäre Hypercholesterinämie, molekular diagnostiziert (FHM) oder mittels Kosegregations-Analyse (FHM)). Die klinische Diagnose von familiären Formen der Hypercholesterinämie beruhte auf Gesamt- und/oder LDL-Cholesterinwerten oberhalb der 90. Perzentile und einer Familienanamnese mit mindestens zwei weiteren Familienmitgliedern mit Hypercholesterinämie. Individuen mit Familien mit diesen Merkmalen und Triglyzerid-  
20 werten  $< 3.7$  mmol/L und/oder Sehnenxanthomen wurden als familiäre Hypercholesterinämie, klinisch diagnostiziert, klassifiziert (FHC). Familien mit Individuen ohne Xanthome sowie Triglyzeridwerten  $\geq 3.7$  mmol/L wurden als familiär-kombinierte Hyperlipidämie (FCH) bezeichnet.  
30 Insgesamt 298 Personen stammten aus der "Study on the molecular basis of Triggers Activating a Rise in Triglycerides and cholesterol in Endocrinological and Renal Diseases" (STARTER). Ein Kollektiv von 130 Personen mit biochemisch bestätigtem Diabetes mellitus (Nüchtern-  
40 30 Plasma-Glukosewerte  $> 7.8$  mmol/L) (DIA), 78 Individuen mit Hypothyreose und 14 Individuen mit Niereninsuffizienz (Kreatinin Clearance  $< 50$  ml/min) (RIN) wurden in die Studie eingeschlossen. Bei allen Personen wurden mindestens Alter, Geschlecht und Gesamtcholesterinkonzentrationen  
45 ohne lipidsenkende Behandlung und die klinische bzw. molekularbiologische Diagnose erfasst. Mit Ausnahme der SPREAD Studie wurden die Personen zusätzlich ausführlich  
50

5 klinisch charakterisiert. In der IDA, BMC, SIBSHIP und  
STARTER Studie wurden Grösse, Gewicht, Body-Mass-Index,  
10 Blutdruck, das Vorhandensein oder Fehlen von klinischen  
Anzeichen der Hypercholesterinämie (Sehnenxanthome, Xan-  
5 thelasmen und Arcus lipoides) und Zeichen und Symptome  
von koronarer Herzkrankheit, zerebrovaskulären Erkrankun-  
gen und peripher-arterieller Verschlusskrankheit, sowie  
15 biochemische Parameter wie Plasmakonzentrationen von Ge-  
samtcholesterin, LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin,  
10 Triglyceride und Schilddrüsen-stimulierendes Hormon (TSH)  
bestimmt. Die Dokumentation beinhaltete auch die persön-  
liche Anamnese einer koronaren Herzkrankheit, einer zere-  
20 brovaskulären Erkrankung, einer peripher-arteriellen Ver-  
schlusskrankheit, einer Schilddrüsenerkrankung, eines  
15 Diabetes mellitus, das Ausmass von Alkohol- und Zigaret-  
tenkonsum (in pack years) und, in den SIBSHIP- und  
25 STARTER-Studien, eine ausführliche Familiengeschichte mit  
zusätzlichen Lipoproteinanalysen (z.B. Lipoprotein (a)  
[Lp(a)], Apolipoprotein B etc.). Bei allen diesen Perso-  
20 nen wurden die Proben für die weiteren Tests anonymi-  
30 siert.

#### Material

35 25 Es wurden *Thermus aquaticus* DNA Polymerase  
und Desoxynukleotide von Perkin Elmer Cetus Corporation  
(Norwalk, CT, USA) und von Qiagen (Milden, Deutschland)  
40 verwendet. Die Restriktionsendonukleasen waren von New  
30 England Biolabs Inc. (Beverly, MA, USA) und vorgefärbte  
Protein-Molekulargewichts-Marker und DNA-Molekular-  
gewichts-Marker von Roche Diagnostics (Basel, Schweiz).  
45 Die verwendeten Oligonukleotide wurden durch die Micro-  
synth Inc. (Balgach, Schweiz) synthetisiert. Die DNA wur-  
35 de in 200 µl Reaktionsgefässen mittels PCR Maschinen von  
Perkin Elmer (GeneAmp® PCR-System 9700) und Stratagene  
50 (RoboCycler® Gradient 96 temperature cycler, Stratagene,

5 La Jolla, CA, USA) amplifiziert. Es wurde Agarose von  
BioRad (Irvines, CA, USA) und Polyacrylamid (Acrylamid:  
Bisacrylamid 37.5:1) von Oncor Inc. (Gaithersburg, MD,  
USA) verwendet. Vorgegossene GMA™ Wide Mini S-50 Gele und  
10 5 Spreadex EL 300 Wide Mini S-100 Gele wurden von Elchrom  
Scientific (Cham, Schweiz) gekauft. Vorgegossene Gele für  
die Polyacrylamidgelelektrophorese (Ready Gels 10%) waren  
von BioRad. [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP und Hybond-C Extra-Nitrozellu-  
15 lose-Membranen waren von Amersham International (Bucking-  
10 hamshire, UK). DH5 $\alpha$  Bakterien und 1kb-DNA-Leitern waren  
von GIBCO BRL, Life Technologies (Paisley, UK); QIAmp 96  
DNA blood-Kits, Genomic tip-Kits, QIAquick Extraktions-  
und PCR Purifikations-Kits, QIAprep Spin Miniprep-Kits  
20 und QIAGEN Plasmid Midi-Kits waren von Qiagen.

15

#### 25 Methoden

Die in die Studie eingeschlossenen Individuen  
20 wurden für zwei bekannte DNA-Polymorphismen im Apolipo-  
protein E-Gen, die beide einen Aminosäureaustausch be-  
30 wirken (C112R, R158C), eine in der Schweizer Bevölkerung  
mit hoher Prävalenz vorkommende DNA-Mutation im Apolipo-  
protein B-100 Gen, die einen Aminosäureaustausch  
35 (R3'500Q) verursacht, für einen neuen DNA-Polymorphismus  
im SREBP-1-Gen (G1028G), der zu keinem Aminosäureaus-  
tausch führt, und für einen neuen Polymorphismus im  
SREBP-2-Gen, der zu einem Aminosäureaustausch (A595G)  
40 führt, getestet. Eine Untergruppe dieser Personen, bei  
30 denen weitere Familienmitglieder mit Hypercholesterinämie  
untersucht wurden (SIPSHIP Studie), wurde auf das Vorhan-  
densein von DNA-Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphis-  
men im LDL-Rezeptor-Gen untersucht, was die Durchführung  
45 von Kosegregationsstudien zur Bestätigung von LDL- Rezep-  
35 tordefekten erlaubte. Individuen aus der SIPSHIP Studie  
wurden zusätzlich systematisch für Mutationen im LDLR-Gen  
getestet.

50

55

5

## 1. Lipoprotein Analysen

10

15

20

25

30

35

Nüchtern-Blutproben wurden von allen Personen, die in die Studie eingeschlossen wurden, abgenommen. Lipid- und Lipoproteinanalysen wurden am Zentrallaboratorium der Universitätskliniken Basel durchgeführt, mit Ausnahme einer Untergruppe aus der SIPSHIP Studie mit familiären Formen von Hyperlipoproteinämien, die bei Studieneintritt bereits behandelt waren und bei denen eine Auswaschperiode aufgrund ethischer Überlegungen nicht durchgeführt wurde. In dieser Untergruppe von Patienten wurden die Gesamtcholesterinkonzentrationen im Zentrallabor vor Beginn der medikamentösen Behandlung (pretreatment TC) bestimmt, oder die teilweise in anderen Laboratorien bestimmten Gesamtcholesterinkonzentrationen vor Behandlung wurden von ihren behandelnden Hausärzten erfragt und in die Analyse aufgenommen. LDL-Cholesterin (LDLC) wurde mittels Heparin präzipitiert (Merck, Darmstadt, Deutschland) und mit Hilfe der Friedewald-Formel errechnet. HDL-Cholesterin (HDL) wurde präzipitiert mittels Phosphor-Wolfram-Säure und Magnesium-Ionen (Roche Diagnostics). Gesamtcholesterin (TC), LDLC und HDLC Plasmakonzentrationen wurden mittels der enzymatischen kolorimetrischen Cholesterin 4-Aminophenazon (PAP) - Methode von Roche Diagnostics auf einem Hitachi analyzer, Modell 737, gemessen.

40

## 2. DNA-Extraktionsmethode

45

50

55

30

Genomische Gesamt-DNA der in die Studie eingeschlossenen Personen wurde aus weissen Blutzellen mit Hilfe der Aussalzmethode(1), mit den früher beschriebenen Modifikationen(2), oder mittels der QIAmp™ 96 DNA blood-Kits von Qiagen extrahiert.

### 3. Einzel-Strang-Konformations-Polymorphismus (SSCP)

#### a) Radioaktive Methode

Um LDL-Rezeptorgen-Mutationen nachzuweisen wurden alle 16 Exons des LDL-Rezeptor-Gens mittels der von Hobbs et al. (3) publizierten Oligonukleotide amplifiziert.

Zur Vervielfältigung von Exon 18c des SREBP-1-Gens inklusive der Exon-/Intron-Grenzen, um auch Spleiss-Mutationen zu entdecken, wurde das folgende Paar von Oligonukleotiden verwendet: S1.18cF (Seq. Id. Nr. 9): 5'-TTATTTATAATCTGGGTTTGTGTC-3' und S1.18cR (Seq. Id. Nr. 10): 5'-GGGAAGAGCTAAGTTAAAAGTTGTG-3'. Um Exon 10 des SREBP-2-Gens inklusive dessen Exon-/Intron-Grenzen zu amplifizieren wurden die Oligonukleotide EcoRI S2.10F (Seq. Id. Nr. 15): 5'-CGGAATTGCGCCAGTGACCATTAACACCTTTGA-3' und EcoRI S2.10R (Seq. Id. Nr. 16): 5'-CGGAATTCTGCAGCAAGCCAGTCATCAGCAGCT-3' verwendet. Die PCR wurde in einem Endvolumen von 6 µl in 1x PCR Puffer (Perkin Elmer) unter Verwendung von 1.0 U Taq Polymerase (Qiagen), 74 kBq [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (Amersham) mit einer Endkonzentration von 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 420 µM jeder der vier dNTP (Qiagen) und 8.3 µM jeder der beiden Oligonukleotide durchgeführt.

Für SSCP des LDL-Rezeptor-Gens wurde genomische DNA (200ng) unter den folgenden PCR Bedingungen amplifiziert: 95°C, 180 Sek. (1 Zyklus); 95°C, 45 Sek.; 58°C, 30 Sek.; 72°C, 120 Sek. (29 Zyklen). Für SSCP der SREBP-1 und SREBP-2 Gene wurden 200ng genomischer DNA wie folgt PCR amplifiziert: 95°C, 180 Sek. (1 Zyklus); 95°C, 60 Sek.; 58°C, 30 Sek.; 72°C, 60 Sek. (30 Zyklen). Anschliessend an die PCR wurden 25 µl Denaturierungs-Puffer (95 % Formamid, 0.05 % Bromphenolblau, 0.05 % Xylencyanol, 20 mM EDTA) der PCR Mischung zugegeben. Nach 5 Minuten Denaturierung bei 95°C wurden 6 µl der Mischung auf



ein 7 % Polyacrylamidgel (Acrylamid: Bisacrylamid Mischung 37.5:1), 2x TBE, 1.37 M Glyzerol, Geldicke 0.75 mm) geladen und das Gel wurde in 1x TBE Puffer bei 4°C in einem Kühlraum oder bei Raumtemperatur bei 15-20 V/cm für 12-16 Stunden laufen gelassen. Danach wurde das Gel mit Hilfe eines Vakuumtrockners bei 80°C eine Stunde lang getrocknet und Kodak X-OMAT AR Filme wurden bei Raumtemperatur 3-36 Stunden belichtet.

#### b) Nicht-radioaktive Methode

Zur nicht-radioaktiven Identifizierung von Sequenzvariationen in Exon 10 des SREBP-2 Gens inklusive seiner Exon-/Intron-Grenzen wurden die Oligonukleotide *EcoR* I S2.10F und *EcoR* I S2.10R verwendet. Die PCR wurde in einem Endvolumen von 11 µl in 1x PCR Puffer (Qiagen) unter Verwendung von 1.0 U *Taq* Polymerase (Qiagen) und Endkonzentrationen von 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 909 µM jeder der vier dNTP (Qiagen), und 4.6 µM jeder der beiden Oligonukleotide durchgeführt. Genomische DNA (100ng) wurde unter den folgenden Bedingungen amplifiziert: 95°C, 180 Sek. (1 Zyklus); 95°C, 60 Sek.; 58°C, 30 Sek.; 72°C, 60 Sek. (29 Zyklen). Anschliessend an die PCR wurden 25 µl Denaturierungs- bzw. LaGe-Puffer (97 % Formamid, 0.05 % Bromphenolblau; 0.05 % Xylencyanol, 10mM NaOH) der PCR Mischung zugegeben. Nach 5 Minuten Denaturierung bei 92°C und sofortiger Abkühlung auf Eis für 10 Minuten wurden 6 µl der Mischung auf Elchrom GMA Wide Mini S-50 Gele geladen und mit 1x TAE Puffer (Puffer Temperatur 9°C) bei 6 V/cm in einer Elchrom Sea 2000 Elektrophorese Kammer für 14 Stunden laufen gelassen. Nach Entfernung des Stützplastiks wurde das Gel 40 Minuten lang in 50 ml SYBR® Gold (Arbeitslösung nach Angaben des Herstellers Molecular Probes) in 0.75 x Standard TAE Puffer (4) auf einem Schüttler gefärbt. Nach 40-minütiger Entfärbung in 100 ml destilliertem Wasser auf einer Schüttelmaschine wurde das

Gel analysiert mittels 302 nm UV Durchleuchtung und unter Verwendung eines Gel Doc 1000 Systems von BioRad digitalisiert.

5

#### 4. Sequenzierung von LDL-Rezeptor-Gen-Mutationen und SREBP-1, Exon 18c, und SREBP-2, Exon 10, - Mutationen

Die entdeckten Sequenzvariationen wurden weiter analysiert mittels Subklonierung amplifizierter Exone und anschliessender Sequenzierung des Inserts. Beim LDL-Rezeptor-Gen wurde die PCR-Amplifizierung der entsprechenden Exone mittels der oben beschriebenen Oligonukleotide durchgeführt (3). Im SREBP-1-Gen wurde die PCR-Amplifikation des Exon 18c mittels Oligonukleotiden, die zusätzliche EcoR I-Schnittstellen besaßen, durchgeführt; EcoR I.S1.18cF (Seq. Id. Nr. 11): 5'-CGGAATTCTGAAATTATTATAATCTGGGTTTTGTGTC -3' und EcoR I.S1.18cR (Seq. Id. Nr. 12): 5'-CGGAATTCATCGGGAAGAGCTAAGTTAAAAGTTGTG-3'. Im SREBP-2 Gen wurde die PCR Amplifikation des Exon 10 mittels EcoR I S2.10F: und EcoR I S2.10R: durchgeführt.

Die Amplifikationsreaktionen wurden in einem Endvolumen von 50 µl mit 1x PCR Puffer (Qiagen) unter Verwendung von 2.5 U Taq Polymerase (Qiagen) und Endkonzentrationen von 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 µM jeder der dNTP (Qiagen) und 2.0 µM jeder der beiden Oligonukleotide ausgeführt. Die folgenden Temperaturen wurden mittels eines Robocyclers erreicht: 95°C, 45 Sek.; 58°C, 30 Sek.; 72°C, 45 Sek. (30 Zyklen). Die amplifizierten Fragmente (50 µl) wurden auf ein 1 % Agarosegel, das 0.6 µg/ml Ethidiumbromid enthielt, geladen, ausgeschnitten und mittels des QIAquick™ Extraktions-Kits (Qiagen) gereinigt. Das DNA-Fragment wurde mit 20 U EcoR I für mindestens 3 Stunden verdaut und mit Hilfe des QIAquick™ PCR Purifikations-Kits gereinigt. Der Vektor pcDNA 3.1 His A (3-5 µg) wurde mit 40 U EcoR I für drei Stunden verdaut. Im Anschluss

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

5 daran wurden 20 U Kalb-Intestinal-Peptid (Roche Diagnostics) dazugegeben und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Der Vektor wurde mit dem QIAquick™ PCR Purifikations-Kit gereinigt und mit 50 µl Wasser eluiert. Die Ligation wurde  
10 5 de mittels des Ligations-Kits von Takara durchgeführt. Das gereinigte PCR Produkt (4 µl) und der gereinigte pcDNA3.1 His A Vektor (1 µl) wurden entsprechend den Empfehlungen des Herstellers ligiert und in *E. coli* DH5α Bakterien (Life Technologies) mittels der Hitzeschockmethode  
15 10 (42°C für 45 Sek.) transformiert. Von Personen mit dem Wildtyp, gemäss den SSCP Resultaten, und von Personen mit der Sequenzvariation wurden 5-7 Kolonien ausgewählt und in 10 µl Wasser resuspendiert. Die Genotypisierung zur Festlegung des Vorhandenseins der Sequenzvariation wurde  
20 15 mit 2 µl der Bakteriensuspension und SSCP-Methoden, wie oben beschrieben, durchgeführt. Unabhängige Klone jeder der zwei Zustände (Wildtyp/Mutation) aus zwei unabhängigen PCR wurden sequenziert. Die DNA-Sequenzierung wurde durch die Microsynth AG durchgeführt mittels der Dideoxy-  
25 20 Ketten-Terminations-Methode. Um die Klone zu expandieren wurden 5 µl der übriggebliebenen Suspension zu 3 ml LB Medium, das 100 µg/ml Ampicillin enthielt, gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Von 1.5 ml der Bakteriensuspension wurde die Plasmid-DNA gereinigt unter Verwendung des QIAprep™ Spin Miniprep-Kits (Qiagen).

#### 5. Test auf Apolipoprotein E-Mutationen, die die Plasmacholesterin-konzentration beeinflussen

40 30 Die beiden häufigen Apolipoprotein E Aminosäurepolymorphismen C112R und R158C wurden mittels PCR Amplifikation und anschliessender Verdauung mit *Hha* I  
45 bzw. des Isoschizomers *Cfo* I nach dem Protokoll von Hixson und Vennier (5) identifiziert.  
35

50

55

5

**6. Test auf Apolipoprotein B-Mutationen, die die Plasmacholesterin-konzentration beeinflussen**

10

15

20

25

30

Drei unterschiedliche molekularbiologische Methoden wurden verwendet, um Mutationen zu suchen, die zu einem Aminosäureaustausch an Position 3'500 des Apolipoprotein B-Gens führen. Proben von Personen aus der SREAD Studie (2) mit Gesamtcholesterinkonzentrationen  $\leq$  4.5 mmol/L wurden gepoolt (25 Proben) und mittels der Methoden von Ruzicka et al., 1992(6) und von Schuster et al.(7) auf Mutationen getestet. Personen mit Gesamtcholesterinkonzentrationen  $>$  4.5 mmol/L und positive Pools aus der SPREAD Studie, als auch alle anderen Proben, die bis 1996 untersucht wurden, wurden einzeln mittels allelspezifischer, asymmetrischer PCR, wie oben beschrieben (2), getestet. Von 1996 an wurde diese Methode durch eine site-directed Mutagenese-PCR-Technik, die eine Msp I Restriktionsschnittstelle bei Wildtypproben einführt, ersetzt. Die darauffolgende Verdauung mit Msp I(8) ermöglichte die Identifizierung von Patienten mit der R3'500Q Mutation.

35

**7. Methoden zur Identifikation der SREBP-1, Exon 18c, und SREBP-2, Exon 10, -Polymorphismen mittels Restriktionsenzymverdauung**

40

45

50

Im SREBP-1 Gen wurde das gesamte Exon 18c mittels des Primerpaars S1.18cF und S1.18cR amplifiziert; Exon 18c enthält den Polymorphismus, der eine variable Xmn I Schnittstelle generiert. Im SREBP-2 Gen wurde lediglich der 5' Teil des Exon 10 amplifiziert, der den Polymorphismus enthält, der eine variable Msp I Restriktionsschnittstelle generiert. Auf diese Weise wurde verhindert, dass weitere Msp I-Schnittstellen amplifiziert wurden, und ein komplexes Restriktionsmuster wurde vermieden. Beim SREBP-2 Gen wurden die folgenden Oligonu-

55

5 kleotide verwendet: S2.10P.F (Seq. Id. Nr. 13): 5'-GCCAGTGACCATTAACACCTTTTGA-3' und S2.10P.R (Seq. Id. Nr. 14): 5'-TCGTCTTCAAAGCCTGCCTCAGTGGCTGGC-3'.

10 Zur Darstellung des SREBP-1-Polymorphismus  
5 wurden 80 ng genomischer DNA von den untersuchten Personen unter den nachfolgenden PCR Bedingungen amplifiziert: 95°C, 240 Sek. (1 Zyklus); 95°C, 60 Sek.; 55°C, 60 Sek.; 72°C, 90 Sek. (33 Zyklen). In einem Gesamtvolumen von 25  
15 µl wurden 2.0 µM von jedem der beiden Oligonukleotide, 400 µM jeder der dNTP (Qiagen), 1x PCR Puffer (1.5 mM  
10 MgCl<sub>2</sub> Endkonzentration, Perkin Elmer) und 0.6 U Taq Polymerase (Qiagen) gemischt. Vom nicht-gereinigten Amplikon wurden 20 µl in 1x NE Puffer mittels 16-32 U Xmn I (New  
20 England Laboratories), 0.2 µl 10mg/ml BSA und einer Inkubationstemperatur von 37°C für 5 Stunden verdaut.

25 Zur Darstellung des SREBP-2 Polymorphismus wurden ca. 100 ng genomischer DNA mittels PCR unter den folgenden Bedingungen amplifiziert: 95°C, 30 Sek.; 58°C, 30 Sek.; 72°C, 90 Sek. (30 Zyklen). In einem Gesamtvolumen  
20 von 25 µl wurden 1.37 µM von jedem der beiden Oligonukleotide, 390 µM jeder der dNTP (Qiagen), 1x PCR Puffer (1.5 mM MgCl<sub>2</sub> Endkonzentration, Perkin Elmer) und 0.75 U  
30 Taq Polymerase (Qiagen) gemischt. Vom resultierenden Amplikon wurden 20 µl in 1x NE Puffer mittels 16 U Msp I  
25 und einer Inkubationstemperatur von 37°C für 5 Stunden verdaut. Zur Identifikation der zwei Polymorphismen wurden 6-8 µl der verdauten Reaktionsgemische auf 10 % Polyacrylamid Ready Gele (BioRad) geladen und mit 1x TBE  
35 Puffer bei Raumtemperatur auf 18-22 V/cm für 25-35 Minuten laufen gelassen. Die Gele wurden daraufhin in einer  
40 50 ml 0.5 µg/ml Ethidiumbromid-Lösung für 5 Minuten gefärbt und mittels eines Gel Doc 1000 Systems von BioRad bei einer Wellenlänge von 302 nm UV Licht digitalisiert.

35

50

55

5

### 8. Untersuchung auf LDL-Rezeptor-Mutationen als Ursache für erhöhte Plasmacholesterin-Konzentrationen

10

15

20

Bei einer Untergruppe von 48 Personen wurde die klinische Diagnose einer familiären Hypercholesterinämie aufgrund eines LDL-Rezeptor Defektes bestätigt mittels Kosegregationsstudien unter Verwendung von 10 verschiedenen RFLP im LDL-Rezeptorgen (9,10). Bei 110 von insgesamt 446 Familien wurden alle Exone des LDL-Rezeptorgens mittels SSCP (radioaktive Methode) und der publizierten Oligonukleotide (3) untersucht. Bei 22 Familien wurde das Vorhandensein von LDL-Rezeptor Mutationen durch Subklonieren und Sequenzieren von Exonen, die Sequenzvariationen aufwiesen, bestätigt.

15

25

### 9. Statistische Analyse: Populationsgenetik

30

35

Die Daten des Geneva Survey, einer Studie bei Schulkindern (13) und Daten aus der Swiss MONICA Studie (3,341 Individuen eingeschlossen (14)), wurden verwendet, um alters- und geschlechtsspezifische 90-er Perzentilen für Gesamtcholesterin und Triglyzeride in der Schweiz zu generieren. Alle Berechnungen wurden auf Mackintosh G3 Computern unter Verwendung der FileMaker® Datenbank CARDIOFILE, der StatView® und SuperANOVA® Programme ausgeführt.

40

45

Individuen mit Plasmacholesterin-Konzentrationen unter der 90-er Perzentile wurden als normocholesterinämisch (NC) bezeichnet, Individuen mit Gesamtcholesterin-konzentrationen über der 90-er Perzentile als hypercholesterinämisch (HC). Bei beiden Gruppen wurde der Einfluss des Vorhandenseins der Apo E Mutationen C112R, R158C, und der neuen Aminosäurepolymorphismen im SREBP-2 Gen (A595G) und im SREBP-1 Gen (G1028G) mit Hilfe multivariater Testverfahren bestimmt.

50

55

5                                   **10. Auswertung der nach obigen Angaben erhaltenen Resultate**

10                   5                   **10.1 Assoziation zwischen Polymorphismen in den SREBP-1 und -2 Genen mit Plasma- cholesterinkonzentrationen**

15                   10                   **10.1.1. Nachweis von Mutationen in den SREBP-1 and -2 Genen mit PIC-Werten über 0.25**

20                                   Ein Personenkollektiv wurde auf das Vorhandensein von Sequenzvariationen mittels der Einzelstrang-  
15 Konformation-Polymorphismus-Methode (SSCP) untersucht.  
Ziel war der Nachweis von Polymorphismen, deren Vorkommen eine Häufigkeit erreicht, dass populationsgenetische Untersuchungen vorgenommen werden können. Dazu wurde ein  
25 Polymorphismusinformationsgehalt (PIC) - Wert von über 0.25 festgelegt. Die zwei durch die Einzelstrang-  
20 Konformation-Polymorphismus-Methode nachgewiesenen Sequenzvariationen, die eine im Exon 18c des SREBP-1 Gens und die andere im Exon 10 des SREBP-2 Gens, erfüllen diese Bedingung und wurden deshalb weitergehend charakteri-  
30 siert. Exon 18c des SREBP-1 Gens und Exon 10 des SREBP-2 Gens von Personen, die die entsprechenden, vom Wildtyp abweichenden SSCP - Muster aufwiesen, wurden amplifiziert. Diese Exonsequenzen wurden subkloniert und sequen-  
35 ziert.

40                   30                   Figur 1A zeigt das Chromatogramm einer Person, die Träger eines DNA Polymorphismus an Aminosäureposition 1028 im Exon 18c des SREBP-1 Gens (G1028G) ist.  
45 Figur 1B zeigt das Chromatogramm einer Person, bei der ein DNA Polymorphismus, der zu einem Aminosäureaustausch  
35 an Position 595 im SREBP-2 Gen führt (A595G), nachgewiesen wurde.

50

55

Im SREBP-1 Gen fand sich eine Basensubstitution C → G im Exon 18c. Diese Basensubstitution führt nicht zu einem Aminosäureaustausch, generiert aber eine *Xmn* I Restriktionsschnittstelle (Figur 1A). Im SREBP-2 Gen wurde eine Basensubstitution C → G entdeckt. Diese Basensubstitution führt zu einem Austausch von Alanin zu Glycin in der Aminosäuresequenz und generiert eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle *Msp* I (Figur 1).

Die entsprechenden PIC - Werte, die aus allen eingeschlossenen Personen mit Ausnahme der verwandten Individuen aus der SIBSHIP Studie (N=2'446) errechnet wurden, betrugen 0.368 für den SREBP-1-Genpolymorphismus und 0.300 für den SREBP-2- Genpolymorphismus. Um grössere Kollektive hinsichtlich dieser Polymorphismen screenen zu können, wurde für jeden der beiden Polymorphismen eine Methode entwickelt, die auf einer PCR Amplifikation des entsprechenden DNA Abschnitts und darauffolgender Restriktionsenzymverdauung beruht (Figur 2). Weder der G1028G Polymorphismus noch der A595G Polymorphismus wichen signifikant vom Hardy - Weinberg Gleichgewicht ab ( $P > 0.70$  bzw.  $P > 0.10$ , wenn ein rezessiver Effekt zugrunde gelegt wurde). Bei HeLa Zellen wurde der G1028G Polymorphismus nur auf einem der beiden Allele entdeckt (heterozygot hinsichtlich des G1028G Polymorphismus (12)). Die A595G Mutation konnte bei HeLa Zellen nicht nachgewiesen werden (homozygot hinsichtlich des A595A Polymorphismus (11)).

#### 10.1.2. Populationsgenetik

Insgesamt wurden 3'078 Individuen untersucht; 2600 Individuen, bei denen Gesamtcholesterinwerte ohne Behandlung gemessen wurden, wurden hinsichtlich der Mutationen und Polymorphismen in vier Genen getestet. Eine Untergruppe von 954 Personen setzte sich aus Zufallsstichproben von Querschnittsuntersuchungen zusammen



(SPREAD, IDA), 318 waren nicht verwandte Individuen aus der SIBSHIP Studie (eine nicht betroffene Person pro Familie und alle Ehegatten, Schwager und Schwägerinnen, die genetisch unverwandt waren (REL)). Insgesamt 871 Personen wurden aus Patientenkollektiven mit primären und sekundären Hyperlipoproteinämien eingeschlossen. Alle 3'078 Individuen der Patienten- und Kontrollkollektive wurden auf das Vorhandensein der Mutation im Apo B-100 Gen, die zu einem Aminosäureaustausch bei Position 3'500 führt, getestet, um Patienten mit FDB in Kontrollkollektiven und den Patientenkollektiven mit Hyperlipoproteinämien zu identifizieren. Um Patienten mit familiärer Dysbetalipoproteinämie zu identifizieren, wurden alle 3'078 Individuen auf das Vorhandensein der Mutation im Apo E Gen bei Aminosäureposition 158 (E2 Allel) sowie auf das Vorhandensein der Mutation bei Position 112 (E4 Allel) untersucht. Das Vorhandensein von LDL-Rezeptor-Gendefekten führt generell zu einem signifikanten, d.h. zwei- oder dreifachen Anstieg der Gesamtcholesterinkonzentrationen, weshalb nur Patienten mit primären Formen von Hyperlipoproteinämien und deutlich erhöhten Gesamtcholesterinkonzentrationen auf das Vorhandensein dieser Mutationen hin untersucht wurden. Tabelle 1 zeigt eine Uebersicht über die verschiedenen Patienten- und Kontrollkollektive. Personen aus den Kontrollgruppen, die nachweislich unter bestimmten Störungen litten, die zu primären bzw. sekundären Formen von Hyperlipoproteinämie führen, wurden ebenfalls in die Patientenkollektive mit der entsprechenden Störung eingeschlossen. Somit ist die Summe der Personen aller Untergruppen grösser als die Anzahl der Individuen insgesamt (N=2'600). Tabelle 1 stratifiziert die Patienten- und Kontrollkollektive nach Individuen mit Gesamtcholesterinkonzentrationen unterhalb der 90er Perzentile (normocholesterinämisch, NC) und Individuen mit Gesamtcholesterinkonzentrationen oberhalb der 90er Perzentile (hypercholesterinämisch, HC).

Die in Tabelle 1 aufgeführten Patienten- und Kontrollkollektive wurden auf das Vorhandensein des beschriebenen Polymorphismus getestet mittels der oben erläuterten Methoden (Screenen von Personenkollektiven mit hohem Durchsatz).

Drei weitere Gene wurden untersucht: das Apo E Gen (Aminosäurepolymorphismen C112R und R158C), das Apo B-100 Gen (Mutation bei Aminosäureposition 3'500, R3'500Q). Im LDL-Rezeptor-Gen wurden Mutationen, die zu familiärer Hypercholesterinämie führen, mittels SSCP, darauffolgender Amplifikation der entsprechenden Exone, in denen Sequenzvariationen gefunden wurden, Subklonieren und Sequenzieren, identifiziert.

Insgesamt 3'078 Individuen wurden auf das Vorhandensein der Aminosäuresubstitution im Apo B Gen getestet (R3'500Q), sowie auf das Vorhandensein von zwei Aminosäurepolymorphismen im Apo E Gen (C112R oder E4 Allel, R158C oder E2 Allel), von denen bekannt ist, dass alle drei Mutationen die Plasmacholesterinkonzentration modifizieren.

Ausserdem sind 2'600 Personen hinsichtlich eines neuen DNA Polymorphismus im SREBP-1 Gen (G1028G) untersucht worden, der als Marker benutzt wurde. Alle 3'078 Personen wurden hinsichtlich eines neuen DNA Polymorphismus im SREBP-2 Gen (A595G) getestet, der zu einem Aminosäureaustausch führt.

Bei diesen Personen wurden die Plasmagesamtcholesterinkonzentrationen gemessen. Von den 3'078 eingeschlossenen Personen nahmen 478 lipidsenkende Medikamente bei Studieneintritt; Gesamtcholesterinkonzentrationen ohne Behandlung standen nicht zur Verfügung, weshalb diese Personen von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen wurden. Von den übrigen 2'600 Personen wurden dann, wie beschrieben, Plasmagesamtcholesterinkonzentrationen ohne Behandlung, standardisiert für ein Alter von 50 Jahren, in die weitergehende Analyse aufgenommen. Tabelle 2 fasst die Resultate der Prävalenz der beiden Po-

5 lymorphismen in den entsprechenden Untergruppen der Pati-  
enten- und Kontrollkollektive sowie die gemittelten Ge-  
10 samtcholesterinkonzentrationen der verschiedenen Unter-  
gruppen im Verhältnis zum Vorhandensein des Polymorphis-  
5 mus zusammen.

Insgesamt zeigte sich ein hoch signifikanter,  
cholesterinsenkender Effekt der A595G Mutation im SREBP-2  
Gen (Tabelle 2, N=2'600; P=0.0005). Dieser Effekt war  
15 noch ausgeprägter, falls die homozygoten Träger der C112R  
10 Mutation im Apo E Gen (E4/E4) (N=107) von der Untersu-  
chung ausgeschlossen wurden (N=2'493; P<0.0001). Verwen-  
dete man nur genetisch unverwandte Personen für die Un-  
tersuchung, schloss also verwandte Personen aus der  
20 SIBSHIP Studie aus, sank die Wahrscheinlichkeit noch  
15 mehr, dass der Unterschied auf Zufall basierte (N=2'446,  
P=0.0003). Figur 3 zeigt die Analyse des Kollektivs un-  
25 verwandter Personen (N=2'446), welches sich aus allen In-  
dividuen mit Ausnahme der genetisch verwandten aus der  
SIBSHIP Studie zusammensetzte, nach Stratifizierung hin-  
20 sichtlich verschiedener Kriterien. Figur 3A and B veran-  
schaulichen den Effekt der G1028G und A595G Polymorphis-  
30 men bei zufällig ausgewählten Individuen. Zufallsstich-  
proben (als solche festgelegt) hinsichtlich Hyperchole-  
sterinämie waren die SPREAD und IDA Studien sowie die  
35 Kollektive unverwandter, nicht betroffener Individuen  
(REL), und Personen, die aufgrund von möglichen Beein-  
trächtigungen der Gedächtnisfunktion (MCS) ausgewählt  
wurden. Aufgrund des Vorhandenseins einer Hypercholeste-  
40 rinämie wurden die restlichen Kollektive ausgewählt  
30 (nicht zufällig). Mittels Varianzanalysen (ANOVA, Scheffé  
Test) konnte ein signifikanter Effekt für den G1028G Po-  
lymorphismus nachgewiesen werden, wenn das Kollektiv hin-  
45 sichtlich der Auswahlgruppe (zufällig/nicht zufällig)  
stratifiziert wurde (P=0.0164). Ebenso konnte der Effekt  
35 in beiden Gruppen bezüglich der A595G Mutation gezeigt  
werden; ANOVA ergab eine Wahrscheinlichkeit, dass der Un-  
terschied auf Zufall basierte, von P<0.0001. Figuren 3C

5 und D zeigen die Stratifizierung hinsichtlich der 90er  
Percentile (NC, HC). Beim G1028G Polymorphismus ergab  
sich ein signifikanter Effekt unter Anwendung von ANOVA  
( $P=0.0088$ ). Bei der A595G Mutation zeigte die Analyse  
10 nach Berücksichtigung des zusätzlichen Faktors ebenfalls  
eine Wahrscheinlichkeit von  $P<0.0001$ .

Ausserdem konnte der bekannte, cholesterinmo-  
difizierende Effekt der Apo E Gen Polymorphismen C112R  
15 ( $\epsilon 4$ ) und R158C ( $\epsilon 2$ ) im getesteten Untersuchungskollektiv  
20 gezeigt werden ( $N=2'600$ ;  $P<0.0001$ ).

Figuren 3, E und F, verdeutlichen die Gen -  
Gen - Interaktionen zwischen Apo E und den SREBP-1 und -2  
20 Genen. Wurden alle 2'600 Individuen in die Untersuchung  
eingeschlossen, war kein signifikanter, cholesterinmodi-  
15 fizierender Effekt des G1028G Polymorphismus im SREBP-1  
Gen nachweisbar. Nach Einbeziehen der Effekte der Apo E  
25 Gene in der Analyse, war für den G1028G Polymorphismus  
der Unterschied zwischen der homozygoten Form des Poly-  
morphismus (22) und den anderen zwei Allelen (11/12)  
20 nicht signifikant (ANOVA,  $P=0.0722$ ). Wurden jedoch homo-  
zygote oder heterozygote Träger der Apo E C112R ( $\epsilon 4$ ) Mu-  
30 tation ausgeschlossen ( $N=761$ ), war der Effekt des Fehlens  
des Wildtyp - Allels auf die Plasmagesamtcholesterinkon-  
zentrationen hoch signifikant ( $N=1'839$ ;  $P<0.0001$ ). Beim  
35 A595G Polymorphismus war der Unterschied zwischen der ho-  
mozygoten Form des Wildtyp (11) und der anderen beiden  
Allele (12/22) schon hoch signifikant ( $P=0.0002$ ) nach  
Einbeziehen der Effekte der Apo E Gene in die Analyse.  
40 Wenn homozygote oder heterozygote Träger der Apo E C112R  
30 ( $\epsilon 4$ ) Mutation ausgeschlossen wurden, sank die Wahrschein-  
lichkeit eines auf Zufall beruhenden Effekts weiter  
( $P<0.0001$ ).

45 Eine weitere Stratifizierung der Kollektive  
hinsichtlich der zugrunde liegenden Störungen, die entwe-  
35 der eine primäre oder sekundäre Hypercholesterinämie ver-  
ursachen, ist in Tabelle 2 dargestellt. Die Resultate der  
Häufigkeitsberechnungen der beiden Polymorphismen  
50

5 (G1028G, A595G) entsprechend den verschiedenen Untergrup-  
pen finden sich in der ersten Zeile. Die Ergebnisse der  
gemittelten Gesamtcholesterinwerte ohne Behandlung in den  
verschiedenen Untergruppen, stratifiziert bezüglich des  
10 5 Vorhandenseins oder Fehlens der G1028G und A595G Polymor-  
phismen, werden in der zweiten Zeile gezeigt (Tabelle 2).  
In den Untergruppen mit primären Hyperlipidämien hatte  
der Effekt der A595G Mutation statistische Relevanz in  
15 der Patientengruppe mit FDL ( $P=0.0020$ ) und in der Patien-  
20 tengruppe mit primärer Hypercholesterinämie (PHC). Bei  
diesen Patienten waren Mutationen in den Apo E, Apo B und  
LDL Rezeptor Genen ausgeschlossen worden, obgleich ein  
autosomal-dominant oder -rezessiv vererbter Gendefekt als  
Ursache für Hypercholesterinämie vermutet wurde. In dem  
15 letztgenannten Kollektiv war die Prävalenz des Wildtyp  
(11) Allels signifikant höher (9.38%) als in der Summe  
der anderen Kollektive (6.69%) ( $P=0.0328$ ).

25 Hinsichtlich der Kollektive mit sekundären  
Hyperlipoproteinämien (hierzu gehören sowohl als NC als  
20 auch als HC klassifizierte Personen), konnte bei Männern  
mit Diabetes mellitus und normalen Plasmatriglyceridkon-  
zentrationen ( $TG < 2.3 \text{ mmol/L}$ ) ein signifikanter Unterschied  
30 zwischen A595A (11) und A595G (12/22) positiven Individu-  
en festgestellt werden ( $P=0.0018$ ). Bei 11.6% der Indivi-  
35 duen mit sekundären Hyperlipoproteinämien waren die Plas-  
matriglyceridkonzentrationen erhöht.

Im SREBP-1 Gen betrug die Prävalenz des Wild-  
typ Allels im homozygoten Zustand (11) 40.35%, die Präva-  
40 lenz des G1028G Polymorphismus im heterozygoten Zustand  
30 (12) 45.62% und im homozygoten Zustand (22) 14.04%  
( $N=2'600$ ). Im SREBP-2 Gen war die Prävalenz des Wildtyp-  
im homozygoten Zustand (11) 6.69%, die Prävalenz der  
45 A595G Mutation im heterozygoten Zustand (12) 35.15% und  
im homozygoten Zustand (22) 58.15% ( $N=2'600$ ).

35 Um den Effekt der entdeckten DNA- und Ami-  
nosäurepolymorphismen auf die Plasmagesamtcholesterinkon-  
zentrationen zu erklären, wurden 3'078 Individuen moleku-

50

55

largetenetisch untersucht. Bei 2'600 Personen konnten sowohl demographische als auch klinische Daten ergänzt werden mit Angaben zu Alter, Geschlecht, Gesamtcholesterinkonzentrationen ohne Behandlung mit lipidsenkenden Medikamenten zum Zeitpunkt der Cholesterinbestimmung, Genotyp hinsichtlich des Apo E Aminosäurepolymorphismus (C112R oder  $\epsilon 4$  Allel, R158C oder  $\epsilon 2$  Allel), und zur Apo B100 Mutation, die zuerst als ursächlich für FDB (R3'500Q) entdeckt wurde. Der R158C Aminosäurepolymorphismus hat im homozygoten Zustand einen cholesterinmodifizierenden Effekt in der untersuchten Population ( $P < 0.0001$ ). Bei Personen, die Träger der R3'500Q Mutation (FDB) sind, waren die Gesamtcholesterinkonzentrationen erhöht im Vergleich zu Personen ohne Apo B Defekt ( $P < 0.0001$ ). Bei Personen mit nachgewiesenen LDL Rezeptor Mutationen (FHM) waren die gemittelten Gesamtcholesterinkonzentrationen im Vergleich zu den Kontrollen erhöht ( $P < 0.0001$ ). Insgesamt beeinflusst der im SREBP-1 Gen entdeckte DNA Polymorphismus (G1028G) die Plasmagesamtcholesterinkonzentrationen bei dieser Personengruppe nicht signifikant. In Kombination mit dem Vorhandensein der Apo B R3'500Q Mutation war der G1028G (22) Polymorphismus jedoch signifikant mit einem Anstieg der Plasmacholesterin-Konzentrationen assoziiert ( $P = 0.0097$ ). Eine weitergehende Stratifizierung der an der Studie beteiligten Personen entsprechend der zugrunde liegenden genetischen Störungen oder der klinischen Diagnose bestätigte den Effekt des neuen SREBP-2 Aminosäurepolymorphismus auf Plasmagesamtcholesterinkonzentrationen bei fast allen Gruppen, aber keiner der Unterschiede erreichte statistische Signifikanz ausser bei der Patientengruppe mit familiärer Dysbetalipoproteinämie, FDL, und bei Personen, die an Hypercholesterinämie aufgrund unbekannter Gendefekte leiden (PHC).

35

#### 10.2. Assoziation der A595G Mutation mit seniler Demenz vom Alzheimer Typ

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

5

10

15

10

Ein anderes bemerkenswertes Resultat der vorliegenden Studie ist die signifikante Differenz der Prävalenz des Wild-Typ Allels (A595A) verglichen mit der Aminosäuresubstitution (A595G), beim Vergleich eines klinisch diagnostizierten Alzheimerpatientenkollektivs mit der Prävalenz in der Allgemeinbevölkerung (Tabelle 2, 2.4% versus 7.0%;  $P = 0.0234$ ).

20

### 10.3. Assoziation des G1028G Polymorphismus mit einem fehlenden Anstieg der Plasmalipid-Konzentration nach Gabe von Proteasehemmer bei HIV-Patienten

25

15

Die Resultate betreffend Prävalenzunterschiede sind ebenfalls in Tabelle 2 dargestellt ( $P = 0.0339$ ). Figur 4 zeigt die prozentuale Änderung der Plasmacholesterinspiegel vor und nach Gabe von Proteasehemmern in Abhängigkeit vom G1028G Polymorphismus.

20

30

## 11. Studie umfassend den Polymorphismus in Exon 6 von SREBP-2

35

25

### 11.1. Grundlagen

#### Probanden

40

30

Es wurden insgesamt 1'081 Probanden aus denselben Gruppen wie bereits oben ausgeführt (711 aus der SPREAD Studie, 346 aus der IDA-Studie sowie 24 aus einem prospektiv untersuchten Kollektiv von in Basel Verstorbenen (PATH-Studie)) in diese Untersuchung aufgenommen.

45

#### Material

Neben den bereits beschriebenen Materialien wurde zusätzlich das Restriktionsenzym Dde I (New England Biolabs) verwendet.

50

55

5

### Methoden

10

Die in die Studie eingeschlossenen Probanden wurden zusätzlich für eine weitere Mutation im SREBP-2-Gen (Exon 6), die zu einem Aminosäureaustausch (R371K) führt, getestet.

15

Die SREBP-2 R371K Mutation wurde im wesentlichen wie bereits beschrieben untersucht. Insbesondere wurde für die Lipoprotein Analysen, die DNS-Extraktionsmethode sowie für die Bestimmung des Einzel-Strang-Konformations-Polymorphismus (SSCP) nach der nicht-radioaktive Methode wie oben beschrieben vorgegangen.

20

15

### **11.2. Sequenzierung der SREBP-2, Exon 6-**

#### **Mutation**

25

Diese wurde wie bereits beschrieben durchgeführt, mit den folgenden Modifikationen: Im SREBP-2 Gen wurde die PCR-Amplifikation des Exons 6 mittels der Oligonukleotide *EcoR* I.S2.6F (Seq. Id. Nr. 17): 5'-CGGAATTCTGGTCTCACTGTGTTTCACTCATC-3' und *EcoR* I.S2.6R (Seq. Id. Nr. 18): 5'-CGGAATTCGCCAGGGCTGACAAGCCTTTTCTCA-3' durchgeführt. Die Amplifikationsreaktion wurde in einem Endvolumen von 50 µl mit 1x Puffer (Qiagen) unter Verwendung von 0.4 U *Taq* Polymerase (Qiagen) und Endkonzentrationen von 3.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 455 µM jeder der dNTP (Qiagen) und 2.0 µM jeder der beiden Oligonukleotide bei den folgenden Temperaturen ausgeführt: 94°C (45"); 56°C (30"); 72°C (1'); 32 Zyklen. Die amplifizierte Fragmente wurden mittels Subklonierung und anschließender Sequenzierung des Inserts (wie bereits beschrieben) analysiert.

30

35

40

30

45

### **11.3. Methoden zur Identifikation der SREBP-**

#### **2, Exon 5 Mutation mittels Restriktionsenzymverdauung**

50

Zur Darstellung der SREBP-2-Mutation (Exon 6, R371K) wurden ca. 100 ng genomischer DNS mittels der be-

55



5 reits oben beschriebenen Methoden unter Verwendung der  
Oligonukleotide EcoR I.S2.6F und EcoR I.S2.6R amplifi-  
ziert. 20µl wurden in 1x NE Puffer mittels 7 U Dde I und  
10 5 daut. Zu dem verdauten Reaktionsgemisch wurden 4µl 5x  
nicht-denaturierender Ladepuffer (Elchrom) dazugegeben.  
7µl dieser Mischung wurden auf Spreadex Wide-Mini S-100  
Gele (Elchrom) geladen, bei 55°C auf 10V/cm für 25-45 Mi-  
15 nuten laufen gelassen, mit Ethidiumbromid gefärbt (40 Mi-  
nuten), entfärbt mit destilliertem Wasser (40 Minuten),  
20 und mittels eines Gel Doc 1000 Systems digitalisiert.

#### 20 11.4. Statistische Methoden

Zum Vergleich der Prävalenzen von Sequenzva-  
15 riationen in den SREBP-1 und -2 Genen wurde der Chi-  
Quadrat-Test angewandt.

#### 25 11.5. Auswertung der nach obigen Angaben er- haltenen Resultate

20 Der Altersmedian bei den 698 Probanden der  
SPREAD-Studie betrug 20.5 Jahre (Altersbereich 18.8 -  
30 43.7 Jahre), der Altersmedian bei den 370 Probanden der  
IDA-Studie 74.5 Jahre (Altersbereich 47.0 - 95.4 Jahre).  
Der Vergleich der zwei Gruppen von Probanden, die nicht  
35 25 selektioniert, aber unterschiedlichen Alters waren, zeig-  
te statistisch signifikante Unterschiede im Vorhandensein  
von SREBP-1 und SREBP-2 Mutationen.

Die Prävalenz des Fehlens des SREBP-1c-G1028G  
40 Polymorphismus in homozygoter Form (d.h. Genotyp 11/12)  
30 bei den Probanden der SPREAD Studie betrug 622/711 (87.5  
%) gegenüber nurmehr 304/367 (82.8%) bei den Probanden  
der IDA/PATH Studie. Dies ergibt einen Unterschied von  
absolut -4.7% (bzw. relativ -5.4%) mit einem P-Wert von  
45 0.038 (Chi-Quadrat Test).

35 Die Prävalenz des Fehlens des SREBP-2 A595G  
Polymorphismus in homozygoter Form (d.h. Genotyp 11/12)  
50 bei den Probanden der SPREAD Studie betrug 305/711

(43.0%) gegenüber nurmehr 135/370 (36.5%) bei den Probanden der IDA/PATH Studie. Dies ergibt einen Unterschied von absolut -6.8% (bzw. relativ -15.1%) mit einem P-Wert von 0.041.

Die Prävalenz der SREBP-2 R371K Mutation bei den Probanden der SPREAD Studie betrug 19/698 (2.7%) gegenüber nurmehr 3/370 (0.8%) bei den Probanden der IDA/PATH Studie. Dies ergibt einen Unterschied von absolut -1.9 (bzw. relativ -70.4%) mit einem P-Wert von 0.036.

#### 11.6. Diskussion

Die Unterschiede in den Prävalenzen in den Gruppen von jüngeren bzw. älteren Probanden können nur durch Unterschiede in der Mortalität erklärt werden, da beide Stichproben aus derselben Bevölkerung gezogen wurden.

Bei der IDA/PATH-Studienpopulation mit einem Altersmedian von 74.5 Jahren sind demnach bereits zahlreiche Probanden verstorben, die Träger des SREBP-2 G1'028G Genotyps 11/12 sind: 316 Träger wurden in dieser Gruppe aufgrund der Daten der SPREAD-Studie erwartet, aber nur 304 Probanden wurden mit diesem Genotyp (11/12) beobachtet, 12 Probanden fehlen demnach in dieser Gruppe.

Dasselbe gilt für die Träger des SREBP-2 A595G Genotyps 11/12: 159 Träger wurden in dieser Gruppe aufgrund der Daten der SPREAD-Studie erwartet, aber nur 135 Probanden wurden mit diesem Genotyp (11/12) beobachtet, 24 Probanden fehlen demnach in dieser Gruppe.

Ebenfalls gilt dies für die selteneren Träger der SREBP-2 R371K-Mutation: 10 Träger wurden in dieser Gruppe aufgrund der Daten der SPREAD-Studie erwartet, aber nur 3 Probanden wurden mit dieser Mutation beobachtet, 7 Probanden fehlen demnach in dieser Gruppe.

Eine Erklärung für die signifikant niedrigere Prävalenz bestimmter Sequenzvariationen in SREBP-1 und SREBP-2 ist die erhöhte Mortalität bei Trägern der Geno-

5           typen SREBP-1.18c (11/12), SREBP-2.10 (11/12) und den  
Trägern der SREBP-2 R371K Mutation. Dies kann beispiels-  
weise durch die bereits beschriebene Assoziation zur Er-  
höhung des Plasmacholesterinspiegels mit der Folge einer  
10           5 koronaren Herzkrankheit bedingt sein, aber auch durch das  
überproportionale Auftreten von Krankheiten, wie bei-  
spielsweise der senilen Demenz vom Alzheimer Typ, wie  
ebenfalls bereits beschrieben, durch die beider genannten  
15           oder durch Kombinationen mit weiteren Risikofaktoren.

10

20

25

30

35

40

45

50

55

Tabelle 1

| Kollektiv  | Studien                              | Beschreibung des Kollektivs                             | Alter | Geschlecht | Alle Individuen |           | normcholesterinämische Individuen <sup>1)</sup> |      | Hypercholesterinämische Individuen <sup>1)</sup> |       |                        |       |                |  |
|--|--------------------------------------|---|-------|------------|-----------------|-----------|---|------|--|-------|------------------------|-------|----------------|--|
|  |                                      |   |       |            | Mittelwert      | m / (m+w) | A<br>Mittelwert (±1SD)                          | TC   | A<br>Mittelwert (±1SD)                           | TC    | A<br>Mittelwert (±1SD) | TC    |                |  |
|  |                                      |   |       |            |                 |           |   |      |  |       |                        |       |                |  |
| Alle Individuen  |                                      |   |       |            |                 |           |   |      |  |       |                        |       |                |  |
| TTL  | SPREAD, SIBSHIP<br>IDA, MCS, STARTER | Alle Altersgruppen                                      | 45.55 | 0.66       | 2600            | 6.84      | ±2.52   | 1980 | 5.80   | ±1.32 | 620                    | 10.14 | ±2.58          |  |
| Kollektive zufällig ausgewählter Individuen  |                                      |   |       |            |                 |           |   |      |  |       |                        |       |                |  |
| RDM, YNG   | SPREAD                               | Zufallsstichprobe (jung)                                | 20.77 | 1.00       | 630             | 5.12      | ±0.88   | 612  | 5.05   | ±0.78 | 18                     | 7.40  | ±1.17          |  |
| RDM, ELD   | IDA                                  | Zufallsstichprobe (älter)                               | 75.98 | 0.67       | 324             | 6.46      | ±1.49   | 316  | 6.39   | ±1.45 | 8                      | 8.93  | ±1.01          |  |
| Kollektive von Individuen mit Störungen, die primäre Hyperlipoproteinämien verursachen |                                      |   |       |            |                 |           |   |      |  |       |                        |       |                |  |
| FDL  | SPREAD, SIBSHIP<br>IDA, MCS, STARTER | Apolipoprotein E Defekt (R158C, homozygot)              | 46.17 | 0.76       | 46              | 9.90      | ±4.10   | 15   | 5.27   | ±1.43 | 31                     | 12.15 | ±2.89<br>→ FDL |  |
| FDB  | SPREAD, SIBSHIP<br>IDA, MCS, STARTER | Apolipoprotein B Defekt (R3500Q, heterozygot)           | 41.49 | 0.54       | 37              | 9.04      | ±1.34   | 5    | 6.93   | ±0.86 | 32                     | 9.38  | ±1.08<br>→ FDB |  |
| FHM  | SIBSHIP                              | LDLR Defekt (molekular-genet. nachgewiesen)             | 34.87 | 0.51       | 74              | 10.93     | ±2.43   |      |  |       | 74                     | 10.93 | ±2.43<br>→ FHM |  |
| PHC  | SPREAD, SIBSHIP                      | Primäre, isolierte Hypercholesterinämie <sup>2)</sup>   | 40.58 | 0.55       | 341             | 9.90      | ±2.62   |      |  |       | 341                    | 9.90  | ±2.62          |  |
| PCI  | SIBSHIP                              | Primäre, kombinierte Hyperlipoproteinämie <sup>3)</sup> | 47.48 | 0.82       | 85              | 9.98      | ±2.22   |      |  |       | 85                     | 9.98  | ±2.22<br>→ PCI |  |
| REL  | SIBSHIP                              | Verwandte, nicht betroffen <sup>1)</sup>                | 40.19 | 0.54       | 318             | 6.39      | ±1.19   | 310  | 6.35   | ±1.17 | 8                      | 8.11  | ±0.34          |  |

Kollektive von Individuen mit Störungen, die sekundäre Hyperlipoproteinämien verursachen<sup>1</sup>

|     |                            |   |       |      |     |      |       |     |      |       |    |                |       |
|-----|----------------------------|---|-------|------|-----|------|-------|-----|------|-------|----|----------------|-------|
| DIA | STARTER,SIBSHIP<br>IDA,MCS | Diabetes mellitus<br>(Glucoseplasma >7.8mmol/L) | 50.96 | 0.59 | 229 | 6.48 | ±1.97 | 191 | 5.87 | ±1.21 | 38 | 9.55<br>→ SHL  | ±2.20 |
| RIN | STARTER,SIBSHIP<br>IDA,MCS | Niereninsuffizienz<br>(Klärung < 50ml/min.)     | 76.63 | 0.44 | 131 | 7.17 | ±2.68 | 115 | 6.83 | ±2.58 | 16 | 9.65<br>→ SHL  | ±2.07 |
| LIV | STARTER,SIBSHIP<br>IDA,MCS | Alkoholkonsum >60g/T<br>und/oder γ-GT >664/l    | 53.32 | 0.85 | 151 | 8.22 | ±2.89 | 86  | 6.49 | ±1.25 | 65 | 10.52<br>→ SHL | ±2.84 |
| HTH | STARTER,SIBSHIP<br>IDA,MCS | Schilddrüsenunterfunktion<br>(TSH > 4.0mIU/L)   | 59.53 | 0.15 | 102 | 6.54 | ±1.97 | 86  | 5.92 | ±1.02 | 16 | 9.86<br>→ SHL  | ±2.49 |

Kollektive von Individuen mit Störungen, die möglicherweise mit SREBP-1 und/oder -2 in Zusammenhang stehen

|         |         |   |       |      |     |      |       |     |      |       |    |      |       |
|---------|---------|---|-------|------|-----|------|-------|-----|------|-------|----|------|-------|
| MEM.TTL | MCS     | Erwachsene<br>(alle Altersgruppen)                              | 70.63 | 0.46 | 413 | 6.24 | ±1.67 | 387 | 6.09 | ±1.61 | 26 | 8.39 | ±0.93 |
| MEM.DAT |         | Demenz vom Alzheimer Typ<br>(MMSE < 26)                         | 73.50 | 41.2 | 165 | 6.16 | ±1.31 | 157 | 6.06 | ±1.25 | 8  | 8.17 | ±0.61 |
| HIV.STB | STARTER | TC, nicht ansteigend unter<br>Proteaseinhibitoren <sup>5)</sup> | 34.24 | 80.0 | 25  | 4.79 | ±1.31 | 24  | 4.70 | ±1.25 | 1  | 7.05 |       |
| HIV.INC |         | TC, ansteigend unter<br>Protease Inhibitoren <sup>5)</sup>      | 38.06 | 85.0 | 20  | 4.52 | ±0.91 | 20  | 4.52 | ±0.91 |    |      |       |

<sup>1)</sup> Normcholesterinämisch: Plasmacholesterin < 90er Perzentile, entsprechend Alter und Geschlecht; hypercholesterinämisch: Plasmacholesterin > 90er Perzentile.

<sup>2)</sup> Zugrunde liegende molekulare Defekte unbekannt

<sup>3)</sup> Nur unverwandte Individuen (eine nicht betroffene Person pro Familie und alle Ehegatten, Schwäger und Schwägerinnen genetisch unverwandt)

<sup>4)</sup> Kombinierte Kollektive aus Individuen, die aufgrund von sekundären Hyperlipoproteinämien ausgewählt wurden, und Individuen aus anderen Kollektiven

<sup>5)</sup> HIV positive Individuen, bei denen die Plasmasgesamtcholesterinkonzentrationen nicht (STB) oder nach Verabreichung von Proteaseinhibitoren ansteigen (INC)

Tabelle 2

| Kollektiv  | SREBP-1 Polymorphismus (G1028G) |       |         |       |         |       | SREBP-2 Polymorphismus (A595G) |        |                    |       |                    |       |       |       |        |       |       |       |         |        |                    |   |                    |   |   |
|--|---------------------------------|-------|---------|-------|---------|-------|--------------------------------|--------|--------------------|-------|--------------------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|---------|--------|--------------------|---|--------------------|---|---|
|  | 11                              |       | 12      |       | 22      |       | P                              |        | ΔPR <sup>(3)</sup> |       | ATC <sup>(5)</sup> |       | 11    |       | 12     |       | 22    |       | P       |        | ΔTC <sup>(6)</sup> |   | APR <sup>(4)</sup> |   |   |
|  |                                 |       |         |       |         |       |                                |        |                    |       |                    |       |       |       |        |       |       |       |         |        |                    |   |                    |   |   |
| Alle Individuen  |                                 |       |         |       |         |       |                                |        |                    |       |                    |       |       |       |        |       |       |       |         |        |                    |   |                    |   |   |
| TTL  | PR                              | 40.35 | (1'049) | 45.62 | (1'186) | 14.04 | (365)                          | -      | -                  | -     | -                  | -     | -     | 6.69  | (174)  | 35.15 | (914) | 58.15 | (1'512) | -      | -                  | - | -                  | - | - |
|  | TC                              | 6.74  | ±2.47   | 6.88  | ±2.53   | 6.99  | ±2.61                          | 0.2309 | -                  | -     | -                  | -     | -     | 7.47  | ±3.48  | 6.83  | ±2.57 | 6.77  | ±2.34   | 0.0005 | -                  | - | -                  | - | - |
| Kollektive zufällig ausgewählter Individuen  |                                 |       |         |       |         |       |                                |        |                    |       |                    |       |       |       |        |       |       |       |         |        |                    |   |                    |   |   |
| RDM.YNG  | PR                              | 41.75 | (263)   | 45.71 | (288)   | 12.54 | (79)                           | 0.3270 | 5.87               | (37)  | 36.51              | (230) | 57.62 | (363) | 0.3445 | -     | -     | -     | -       | -      | -                  | - | -                  | - | - |
|  | TC                              | 5.04  | ±0.87   | 5.15  | ±0.90   | 5.24  | ±0.87                          | 0.1735 | 5.1                | ±0.85 | 5.06               | ±0.91 | 5.15  | ±0.87 | 0.7943 | -     | -     | -     | -       | -      | -                  | - | -                  | - | - |
| RDM.ELD  | PR                              | 41.36 | (134)   | 40.74 | (132)   | 17.90 | (58)                           | 0.0324 | 5.56               | (18)  | 30.25              | (98)  | 64.20 | (208) | 0.3815 | -     | -     | -     | -       | -      | -                  | - | -                  | - | - |
|  | TC                              | 6.50  | ±1.55   | 6.41  | ±1.41   | 6.36  | ±1.53                          | 0.5796 | 6.77               | ±1.51 | 6.55               | ±1.66 | 6.39  | ±1.40 | 0.3525 | -     | -     | -     | -       | -      | -                  | - | -                  | - | - |
| Kollektive von Individuen mit Störungen, die primäre Hyperlipoproteinämien verursachen |                                 |       |         |       |         |       |                                |        |                    |       |                    |       |       |       |        |       |       |       |         |        |                    |   |                    |   |   |
| FDL  | PR                              | 32.26 | (10)    | 41.94 | (13)    | 25.81 | (8)                            | 0.0578 | 9.68               | (3)   | 16.13              | (5)   | 74.19 | (23)  | 0.5034 | -     | -     | -     | -       | -      | -                  | - | -                  | - | - |
|  | TC                              | 12.63 | ±2.78   | 11.54 | ±3.37   | 12.96 | ±2.15                          | 0.4351 | 16.89              | ±3.45 | 10.62              | ±1.76 | 12.01 | ±2.47 | 0.0020 | -     | -     | -     | -       | -      | -                  | - | -                  | - | - |
| FDB  | PR                              | 33.33 | (12)    | 38.89 | (14)    | 16.67 | (6)                            | 0.4401 | 8.33               | (3)   | 44.44              | (16)  | 36.11 | (13)  | 0.5412 | -     | -     | -     | -       | -      | -                  | - | -                  | - | - |
|  | TC                              | 9.99  | ±0.98   | 9.06  | ±1.12   | 8.92  | ±0.68                          | 0.2393 | 8.63               | ±0.22 | 9.21               | ±1.09 | 9.77  | ±1.01 | 0.1989 | -     | -     | -     | -       | -      | -                  | - | -                  | - | - |
| FHM  | PR                              | 33.78 | (25)    | 48.65 | (36)    | 17.57 | (13)                           | 0.3753 | 8.11               | (6)   | 35.14              | (26)  | 56.76 | (42)  | 0.6210 | -     | -     | -     | -       | -      | -                  | - | -                  | - | - |
|  | TC                              | 11.55 | ±1.98   | 10.56 | ±2.09   | 10.74 | ±3.58                          | 0.7579 | 11.15              | ±2.34 | 11.06              | ±2.13 | 10.81 | ±2.59 | 0.8118 | -     | -     | -     | -       | -      | -                  | - | -                  | - | - |
| PHC  | PR                              | 38.12 | (130)   | 48.09 | (164)   | 13.78 | (47)                           | 0.8842 | 9.38               | (32)  | 37.24              | (127) | 53.37 | (182) | 0.0328 | -     | -     | -     | -       | -      | -                  | - | -                  | - | - |
|  | TC                              | 9.74  | ±2.31   | 10.04 | ±2.97   | 9.85  | ±2.06                          | 0.8737 | 10.89              | ±4.82 | 9.90               | ±2.20 | 9.72  | ±2.31 | 0.0240 | -     | -     | -     | -       | -      | -                  | - | -                  | - | - |
| PCH  | PR                              | 41.18 | (35)    | 43.53 | (37)    | 15.29 | (13)                           | 0.7347 | 10.59              | (9)   | 36.47              | (31)  | 52.94 | (45)  | 0.1439 | -     | -     | -     | -       | -      | -                  | - | -                  | - | - |
|  | TC                              | 9.97  | ±2.46   | 9.81  | ±1.82   | 10.50 | ±2.69                          | 0.3650 | 9.71               | ±2.23 | 10.35              | ±2.98 | 9.78  | ±1.53 | 0.7019 | -     | -     | -     | -       | -      | -                  | - | -                  | - | - |
| REL  | PR                              | 39.62 | (126)   | 46.86 | (149)   | 13.52 | (43)                           | 0.7772 | 6.60               | (21)  | 33.33              | (106) | 60.06 | (191) | 0.9462 | -     | -     | -     | -       | -      | -                  | - | -                  | - | - |
|  | TC                              | 6.38  | ±1.16   | 6.44  | ±1.09   | 6.27  | ±1.55                          | 0.4679 | 6.43               | ±1.10 | 6.33               | ±1.26 | 6.42  | ±1.16 | 0.8984 | -     | -     | -     | -       | -      | -                  | - | -                  | - | - |

ERSATZBLATT (REGEL 26)

| Kollektiv  | SREBP-1 Polymorphismus (G1028G) |       |            |       |                         | SREBP-2 Polymorphismus (A595G) |            |        |       |                         |       |      |
|--|---------------------------------|-------|------------|-------|-------------------------|--------------------------------|------------|--------|-------|-------------------------|-------|------|
|  | 11                              | 12    | 22         | P     | $\Delta\text{TC}^{(5)}$ | 11                             | 12         | 22     | P     | $\Delta\text{TC}^{(5)}$ |       |      |
| Prävalenz <sup>1)</sup><br>TC Mittelwert <sup>2)</sup>   |                                 |       |            |       |                         |                                |            |        |       |                         |       |      |
| Kollektive von Individuen mit Störungen, die sekundäre Hyperlipoproteinämien verursachen                   |                                 |       |            |       |                         |                                |            |        |       |                         |       |      |
| DIA  | PR                              | 39.30 | (90)       | 43.67 | (100)                   | 17.03                          | (39)       | 0.1723 | 6.55  | (15)                    |       |      |
|  | TC                              | 6.47  | $\pm 1.78$ | 6.44  | $\pm 1.88$              | 6.62                           | $\pm 2.57$ | 0.6233 | 6.48  | $\pm 1.60$              |       |      |
| RIN  | PR                              | 40.46 | (53)       | 45.80 | (60)                    | 13.74                          | (18)       | 0.9197 | 6.11  | (8)                     |       |      |
|  | TC                              | 7.27  | $\pm 3.37$ | 7.15  | $\pm 2.01$              | 6.96                           | $\pm 2.49$ | 0.7193 | 7.44  | $\pm 2.04$              |       |      |
| LIV  | PR                              | 38.51 | (57)       | 47.30 | (70)                    | 14.19                          | (21)       | 0.9567 | 8.11  | (12)                    |       |      |
|  | TC                              | 8.14  | $\pm 2.55$ | 8.53  | $\pm 3.31$              | 7.92                           | $\pm 2.11$ | 0.6011 | 9.81  | $\pm 4.78$              |       |      |
| HTH  | PR                              | 37.63 | (35)       | 46.24 | (43)                    | 16.13                          | (15)       | 0.5545 | 6.45  | (6)                     |       |      |
|  | TC                              | 6.17  | $\pm 1.80$ | 6.55  | $\pm 1.87$              | 6.00                           | $\pm 1.29$ | 0.2678 | 7.46  | $\pm 1.56$              |       |      |
| Kollektive von Individuen mit Störungen, die möglicherweise mit SREBP-1 und/oder -2 in Zusammenhang stehen |                                 |       |            |       |                         |                                |            |        |       |                         |       |      |
| TTL - DAT  | PR                              | 40.16 | (978)      | 45.59 | (1'110)                 | 14.25                          | (347)      | 6.98   | (170) | 34.99                   | (852) |      |
|  | TC                              | 6.78  | $\pm 2.53$ | 6.82  | $\pm 2.58$              | 7.05                           | $\pm 2.63$ | 0.2225 | 7.48  | $\pm 3.52$              |       |      |
| DAT  | PR                              | 43.03 | (71)       | 46.06 | (76)                    | 10.91                          | (18)       | 0.2318 | 2.42  | (4)                     | 37.58 | (62) |
|  | TC                              | 6.14  | $\pm 1.22$ | 6.24  | $\pm 1.28$              | 5.92                           | $\pm 1.78$ | 0.4050 | 7.44  | $\pm 1.19$              |       |      |
| HIV-STB  | PR                              | 52.00 | (13)       | 28.00 | (7)                     | 20.00                          | (5)        | 0.2772 | 16.00 | (4)                     | 36.00 | (9)  |
|  | TC                              | 4.85  | $\pm 1.53$ | 4.27  | $\pm 0.59$              | 5.37                           | $\pm 1.37$ | 0.2772 | 3.99  | $\pm 0.62$              |       |      |
| HIV-INC  | PR                              | 40.00 | (8)        | 60.00 | (12)                    | 0.00                           | (0)        | 0.0339 | 5.00  | (1)                     | 45.00 | (9)  |
|  | TC                              | 4.26  | $\pm 1.03$ | 4.70  | $\pm 0.82$              | -                              | -          | 2.13   | 4.80  | $\pm 0.26$              |       |      |

<sup>1)</sup> Prävalenz (=PR) in Prozent, (Anzahl der Individuen)

<sup>2)</sup> Mittelwert der Plasmasamcholesterinkonzentrationen (=TC) in mmol/L, ( $\pm$ SD)

<sup>3)</sup>  $\Delta\text{PR}$  = PR11/12 vs. PR22; Signifikanzhöhe (P) des Unterschieds zwischen der Prävalenz des Kollektivs (PR Kollektiv) vs. Prävalenz aller Individuen (PR.TTL) minus Prävalenz des entsprechenden Kollektivs (PR.Kollektiv); (P von PR.Kollektiv vs. (PR.TTL - PR.Kollektiv))

<sup>4)</sup>  $\Delta\text{PR}$  = PR11 vs. PR12/22; Signifikanzhöhe (P) des Unterschieds zwischen der Prävalenz des Kollektivs (PR Kollektiv) vs. Prävalenz aller Individuen (PR.TTL) minus Prävalenz des entsprechenden Kollektivs (PR.Kollektiv); (P von PR.Kollektiv vs. (PR.TTL - PR.Kollektiv))

<sup>5)</sup>  $\Delta\text{TC}$  = TC11/12 vs. TC22 / <sup>6)</sup>  $\Delta\text{TC}$  = TC11 vs. TC12/22

5

52

**Literaturangaben:**

10

(Literatur wird im Text direkt zitiert oder aber es wird  
5 auf die unten angeführten Dokumente durch Nennung der  
entsprechenden Zitatnummer (in Klammer) verwiesen)

15

1. Miller, S. A. 1988. A simple salting out  
10 procedure for extracting DNA from human nucleated cells.  
*Nucleic Acids Res.* 16:1215.

20

2. Miserez, A. R., R. Laager, N. Chiodetti,  
und U. Keller. 1994. High prevalence of familial defecti-  
ve apolipoprotein B-100 in Switzerland. *J. Lipid Res.*  
15 35:574-583.

25

3. Hobbs, H. H., M. S. Brown, und J. L. Gold-  
stein. 1992. Molecular genetics of the LDL receptor gene  
in familial hypercholesterolemia. *Hum. Mutat.* 1:445-466.

30

4. Sambrook, J., E. F. Fritsch, und T. Mania-  
tis. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold  
Spring Harbor Laboratory Press. Second Edition.:

35

5. Hixson, J. E. und D. T. Vernier. 1990. Re-  
striction isotyping of human apolipoprotein E by gene am-  
plification and cleavage with Hha I. *J. Lipid Res.*  
25 31:545-548.

40

6. Ruzicka, V., W. März, A. Russ, und W.  
Gross. 1992. Apolipoprotein B(Arg3500 to Gln) allele spe-  
cific polymerase chain reaction: large-scale screening of  
pooled blood samples. *J. Lipid Res.* 33:1563-1567.

30

7. Schuster, H., G. Rauch, S. Müller, C. Ke-  
ler, G. Wolfram, und N. Zöllner. 1992. Allele-specific  
and asymmetric polymerase chain reaction amplification in  
45 combination: a one step polymerase chain reaction proto-  
col for rapid diagnosis of familial defective apolipopro-  
tein B-100. *Anal. Biochem.* 204:22-25.

35

50

55



5

53

8. Hansen, P. S., N. Rüdiger, A. Tybjaerg-Hansen, O. Faergeman, und N. Gregersen. 1991. Detection of the apoB-3500 mutation (glutamine for arginine) by gene amplification and cleavage with MspI. *J. Lipid Res.* 32:1229-1233.

9. Miserez, A. R., H. Schuster, N. Chiodetti, und U. Keller. 1993. Polymorphic Haplotypes and recombination rates at the LDL receptor gene locus in subjects with and without familial hypercholesterolemia who are from different populations. *Am. J. Hum. Genet.* 52:808-826.

10. Miserez, A. R. und U. Keller. 1995. Differences in the phenotypic characteristics of subjects with familial defective apolipoprotein B-100 and familial hypercholesterolemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15:1719-1729.

11. Hua, X., J. Sakai, Y. K. Ho, J. L. Goldstein, und M. S. Brown. 1995. Hairpin orientation of sterol regulatory element-binding protein-2 in cell membranes as determined by protease protection. *J. Biol. Chem.* 270:29422-29427.

12. Hua, X., C. Yokoyama, J. Wu, M. R. Briggs, M. S. Brown, J. L. Goldstein, und X. Wang. 1993. SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11603-11607.

13. Oberhänsli, I., D. Pometta, H. Micheli, L. Raymond, und A. Suenram. 1982. Lipid, lipoprotein and apo-A and apo-B lipoprotein distribution in Italian and Swiss schoolchildren. The Geneva Survey. *Pediatr. Res.* 16:665-669.

14. Burnand, B., V. Wietlisbach, W. Riesen, G. Nosedà, M. Darazzoni, M. Rickenbach, und F. Gutzwiller. 1993. Lipides sanguins dans la population suisse:

50

55

5

54

enquête MONICA 1988-89. *Schweiz. Med. Wschr.*  
123(Suppl.48):29-37.

10

15. Tontonoz, P., J. B. Kim, R. A. Graves,  
und B. M. Spiegelman. 1993. ADD1: a novel helix-loop-helix  
5 transcription factor associated with adipocyte determina-  
tion and differentiation. *Mol. Cell Biol.* 13:4753-4759.

15

16. Yokoyama, C., X. Wang, M. R. Briggs, A.  
Admon, J. Wu, X. Hua, und J. L. Goldstein. 1993. SREBP-1,  
a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that con-  
10 trols transcription of the low density lipoprotein recep-  
tor gene. *Cell* 75:187-197.

20

17. Kan, H. Y., P. Pissios, J. Chambaz, und  
V. I. Zannis. 1999. DNA binding specificity and transac-  
tivation properties of SREBP-2 bound to multiple sites on  
15 the human apoA-II promoter. *Nucleic Acids Res.*  
27(4):1104-1117.

25

18. Sakai, J., A. Nohturfft, J. L. Goldstein,  
und M. S. Brown. 1998. Cleavage of Sterol Regulatory Ele-  
ment-binding Proteins (SREBPs) at Site-1 Requires Inter-  
30 action with SREBP Cleavage-activating Protein. (Evidence  
from in vivo competition studies). *J. Biol. Chem.*  
273(10):5785-5793.

30

19. Brown, M. S. und J. L. Goldstein. 1997.  
The SREBP Pathway: Regulation of Cholesterol Metabolism  
35 by Proteolysis of a membrane-bound transcription factor.  
25 *Cell* 89:331-340.

35

20. Hua, X., J. Wu, J.L. Goldstein, M.S.  
Brown, und H.H. Hobbs. 1995. Structure of the human gene  
encoding sterol regulatory element binding protein-1  
40 (SREBF1) and localization of SREBF1 and SREBF2 to chromo-  
somes 17p11.2 and 22q13. *Genomics* 25:667-673.

40

21. Miserez, A.R., G. Cao, L. C. Probst, und  
H.H. Hobbs. 1997. Structure of the human gene encoding  
sterol regulatory element binding protein 2 (SREBF2). *Ge-  
35 nomics* 40:31-40.

45

50

55



## Claims

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

5

**Ansprüche**

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

1. Verfahren zur Erkennung eines erhöhten oder erniedrigten Krankheits- und/oder Mortalitätsrisikos und/oder einer erhöhten oder erniedrigten Sensitivität auf Therapieverfahren resp. deren Nebenwirkungen, dadurch gekennzeichnet, dass nach Blut- resp. Gewebeentnahme, das Blut resp. Gewebe auf das Vorhandensein eines Polymorphismus in mindestens einem Sterol-Regulator Element-Bindenden-Protein (SREBP) untersucht wird, wobei das Vorhandensein eines Polymorphismus auf Amino- und/oder Nukleinsäure-Ebene bestimmt wird.

2. Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das SREBP ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend SREBP-1 und SREBP-2.

3. Verfahren gemäss Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Polymorphismus zu einer erhöhten oder erniedrigten Aktivierung von Genen im Lipidstoffwechsel, insbesondere im Cholesterinstoffwechsel führt.

4. Verfahren gemäss Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Polymorphismus zu erhöhter oder erniedrigter Plasmakonzentration mindestens eines Lipids, insbesondere von Cholesterin, führt.

5. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung des Vorhandenseins eines Polymorphismus auf Nukleinsäure-Ebene erfolgt.

6. Verfahren gemäss Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Polymorphismus eine Erkennungssequenz für eine innerhalb des Polymorphismus liegende Schnittstelle aufweist und dass die Untersuchung unter Verwendung dieser Erkennungssequenz erfolgt.

7. Verfahren gemäss Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Erkennungssequenz eine Erkennungssequenz für XmnI oder MspI ist, d.h. GAANNNTTC oder CCGG, wobei N ein beliebiges Nukleotid sein kann.

5 8. Verfahren gemäss Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Untersuchung unter Verwendung einer SREBP-Sequenz oder einer SREBP-Teilsequenz erfolgt, die eine Nukleinsäure-Sequenz ausgewählt aus der Gruppe  
10 5 der nachfolgend aufgeführten Sequenzen, gegebenenfalls zusammen mit weiteren Nukleinsäuren aus der natürlichen Nachbarschaft der entsprechenden Sequenz, umfasst:

SREBP-1, Exon 18c (Seq. Id. Nr. 3):

15 GCACCTAGGGAAAGGCTTC

10 SREBP-2, Exon 10 (Seq. Id. Nr. 7):

CTGCTGCCGGCAACCTACA

20 9. Verfahren gemäss Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Untersuchung unter Verwendung einer SREBP-Sequenz oder einer SREBP-Teilsequenz erfolgt, die die folgende Nukleinsäure-Sequenz, gegebenenfalls zusammen mit weiteren Nukleinsäuren aus der natürlichen Nachbarschaft dieser Sequenz, umfasst:

25 SREBP-2, Exon 6: CTGAAGAAG

30 10. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung des Vorhandenseins eines Polymorphismus auf Aminosäure-Ebene erfolgt.

35 11. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass nach Blut- resp. Gewebeentnahme und DNA-Extraktion mindestens ein Teilstück eines Exons eines SREBP, das einen Polymorphismus enthält, unter Verwendung zweier Oligonukleotidsequenzen amplifiziert wird, wobei der Polymorphismus charakteristisch ist für eine erhöhte oder erniedrigte Aktivierung  
40 30 von Genen im Lipidstoffwechsel insbesondere im Cholesterinstoffwechsel, und dass das Produkt der Amplifikation einer Verdauung mit geeigneten Restriktionsenzymen oder einer Denaturierung unterworfen wird und dass die Verdauungs- resp. Denaturierungsprodukte elektrophoretisch aufgetrennt werden.

45 12. Verfahren gemäss Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, dass der Polymorphismus charakteri-  
50

5 stisch ist für erhöhtes oder erniedrigtes Risiko für Hypercholesterinämie beim Menschen.

13. Verfahren gemäss Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eine der Oligonukleotidsequenzen im Intronbereich angesiedelt ist, der dem Exon benachbart ist, in dem der Polymorphismus existiert.

14. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonukleotidsequenzen ausgewählt sind aus den folgenden Paaren oder damit unter stringenten Bedingungen hybridisierenden Sequenzen:

20 S1.18cF (Seq. Id. Nr. 9):  
5'-TTATTTATAATCTGGGTTTTGTGTC-3' und  
15 S1.18cR (Seq. Id. Nr. 10):  
5'-GGGAAGAGCTAAGTTAAAAGTTGTG-3' oder  
25 EcoR I.S1.18cF (Seq. Id. Nr. 11):  
5'-CGGAATTCTGAAATTTATAATCTGGGTTTTGTGTC-3' und  
EcoR I.S1.18cR (Seq. Id. Nr. 12):  
20 5'-CGGAATTCATCGGGGAAGAGCTAAGTTAAAAGTTGTG-3' oder  
30 S2.10P.F (Seq. Id. Nr. 13):  
5'-GCCAGTGACCATTACACCTTTTGA-3' und  
S2.10P.R. (Seq. Id. Nr. 14):  
5'-TCGTCTCAAAGCCTGCCTCAGTGGCTGGC-3' oder  
35 EcoRI S2.10F (Seq. Id. Nr. 15):  
5'-CGGAATTCGCCAGTGACCATTACACCTTTTGA-3' und  
EcoRI S2.10R (Seq. Id. Nr. 16):  
5'-CGGAATCTGCAGCAAGCCAGTCATCAGCAGCT-3'  
40 EcoRI S2.6F (Seq. Id. Nr. 17):  
30 5'-CGGAATCTGGTCTCACTGTGTTTCACTCATC-3'  
EcoRI S2.6R (Seq. Id. Nr. 18):  
5'-CGGAATTCGCCAGGCTGACAAGCCTTTTCTCA-3'.

15. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass der Polymorphismus ermittelt worden ist durch amplifizieren und analysieren einer interessierenden SREBP-Sequenz, Vergleich der Exon-Bereiche dieser interessierenden Sequenz mit den Exon-

5 Bereichen der Sequenz des in einer Population am häufig-  
sten auftretenden Typs des entsprechenden SREBP und Un-  
tersuchung der Sequenzen mit gefundenen Unterschieden auf  
Fehlfunktion.

10 5 16. Verfahren gemäss Anspruch 15, dadurch ge-  
kennzeichnet, dass die Unterschiede zu einer anderen Ami-  
nosäure und/oder insbesondere zu einer Erkennungsstelle  
für ein Restriktionsenzym führen.

15 17. Verwendung des Verfahrens gemäss einem  
10 der Ansprüche 11 bis 16, zur Bestimmung des erhöhten oder  
erniedrigten Risikos für Hypercholesterinämie und/oder  
Alzheimer Krankheit.

20 18. Verwendung des Verfahrens gemäss einem  
der Ansprüche 1 bis 16 zur Bestimmung eines erhöhten oder  
15 erniedrigten Risikos für das Auftreten von Nebenwirkungen  
bei der HIV-Therapie, insbesondere der Therapie mit Pro-  
teasehemmern.

25 19. Verwendung des Verfahrens gemäss einem  
der Ansprüche 1 bis 16 zur Bestimmung eines erhöhten oder  
20 erniedrigten Mortalitätsrisikos.

30 20. DNA- und/oder RNA-Chip, dadurch gekenn-  
zeichnet, dass er mindestens einen Polymorphismus auf ei-  
nem SREBP, insbesondere SREBP-1 und/oder SREBP-2, auf-  
weist.

35 21. DNA- und/oder RNA-Chip gemäss Anspruch  
20, dadurch gekennzeichnet, dass der Polymorphismus ein  
Polymorphismus auf SREBP-1 und/oder SREBP-2 wie in einem  
der Ansprüche 3,4,6,7,8 und 9 definiert, ist.

40 22. DNA- oder RNA-Chip gemäss Anspruch 20  
30 oder 21, dadurch gekennzeichnet, dass er den SREBP Poly-  
morphismus in Gegenwart anderer Polymorphismen, die für  
die Abschätzung des Risikos für Hypercholesterinämie  
und/oder Alzheimer-Krankheit charakteristisch sind, auf-  
weist.

45 23. Verwendung eines Polymorphismus wie in  
35 einem der Ansprüche 3,4,6,7,8 und 9 definiert oder eines  
Chip gemäss einem der Ansprüche 20 bis 22 als Marker zur

50

55

5 Bestimmung eines erhöhten oder verminderten Risikos für  
den Ausbruch einer Krankheit.

24. Verwendung gemäss Anspruch 23, dadurch  
gekennzeichnet, dass die Krankheit ausgewählt ist aus Hy-  
10 5 percholesterinämie und Alzheimer-Krankheit.

25. Verwendung eines Polymorphismus wie in  
einem der Ansprüche 3,4,6,7,8 und 9 definiert oder eines  
Chip gemäss einem der Ansprüche 20 bis 22 zur Bestimmung  
15 eines erhöhten oder erniedrigten Risikos für das Auftre-  
10 ten von Nebenwirkungen bei der HIV-Therapie, insbesondere  
der Therapie mit Proteasehemmern.

26. Verwendung eines Polymorphismus wie in  
einem der Ansprüche 3,4,6,7,8 und 9 definiert oder eines  
Chip gemäss einem der Ansprüche 20 bis 22 zur Bestimmung  
15 eines erhöhten oder verminderten Mortalitätsrisikos.

27. Verwendung eines Polymorphismus, wie in  
einem der Ansprüche 3,4,6,7,8 und 9 definiert oder eines  
Chip gemäss einem der Ansprüche 20 bis 22 zur Prüfung der  
Eignung einer Behandlungsmethode für eine Krankheit aus-  
20 gewählt aus der Gruppe umfassend Hypercholesterinämie,  
30 Alzheimer-Krankheit und HIV, oder für das Wirkstoffscree-  
ning.

28. Polymorphismus, der charakteristisch ist  
für erhöhtes oder erniedrigtes Risiko für Hypercholeste-  
35 rinämie beim Menschen, dadurch gekennzeichnet, dass er in  
einem Sterol-Regulator Element-Bindenden-Protein (SREBP)  
auftritt.

29. Polymorphismus gemäss Anspruch 28, da-  
durch gekennzeichnet, dass er im SREBP-1 oder SREBP-2  
40 30 auftritt.

30. Polymorphismus gemäss Anspruch 29, da-  
durch gekennzeichnet, dass er eine Erkennungssequenz für  
XmnI oder MspI aufweist, d.h. GAANNNTTC oder CCGG, wobei  
45 N ein beliebiges Nukleotid sein kann.

31. Polymorphismus gemäss Anspruch 30, da-  
durch gekennzeichnet, dass er die folgenden Sequenzen  
aufweist:  
50



5                   SREBP-1, Exon 18c (Seq. Id. Nr. 1):  
GCACCTAGGGAAAGGCTTC

                  SREBP-2, Exon 10 (Seq. Id. Nr. 5):  
10           CTGCTGCCGGCAACCTACA.

15

20

25

30

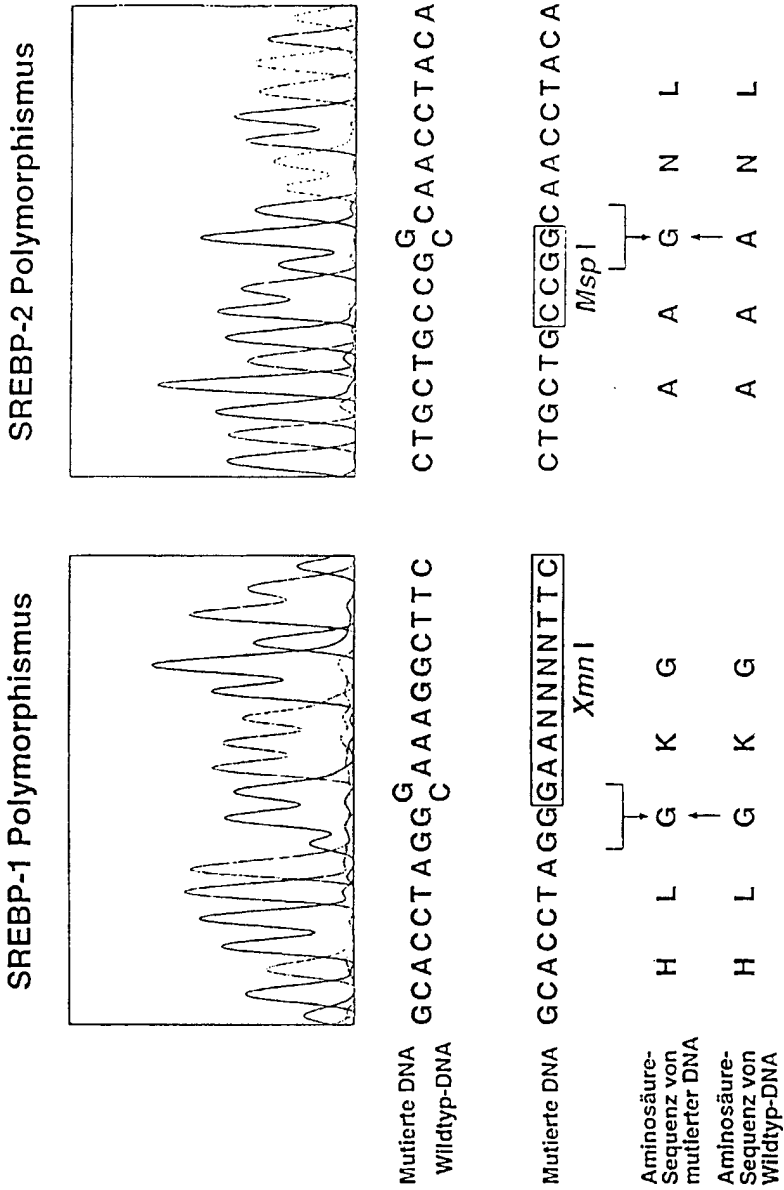
35

40

45

50

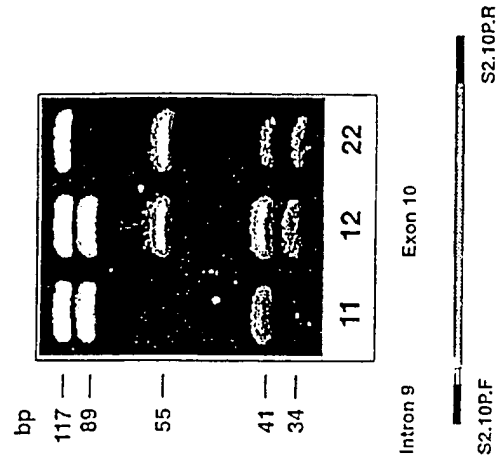
55



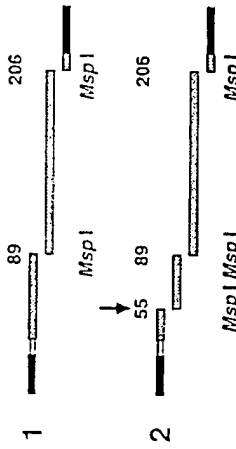
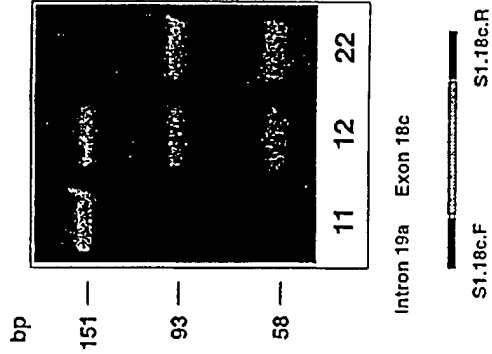
Figur 1A

Figur 1B

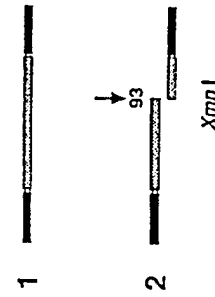
# SREBP-2 Polymorphism



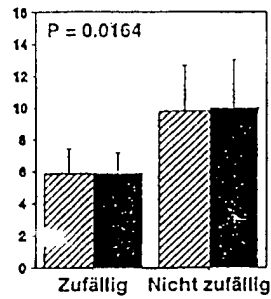
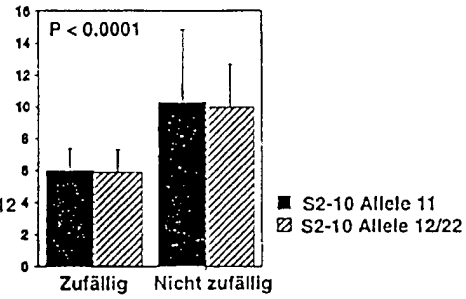
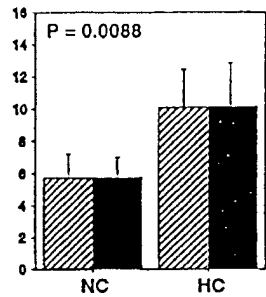
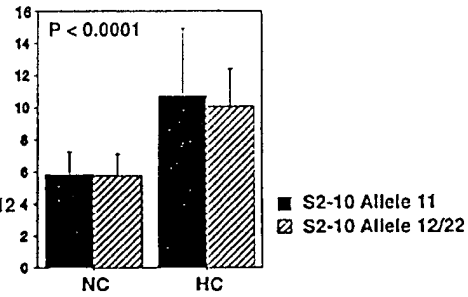
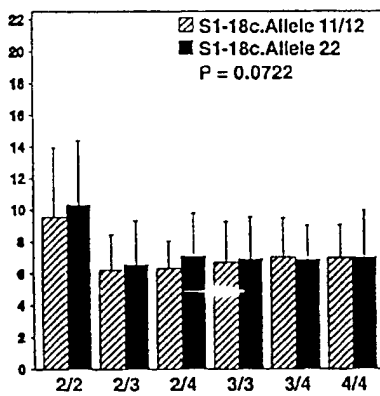
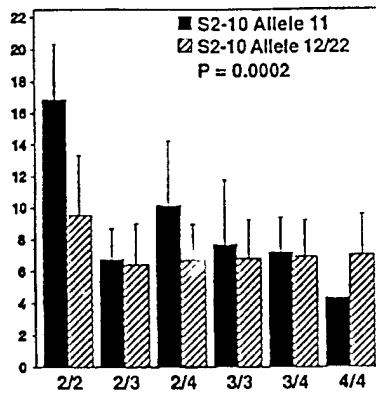
# SREBP-1 Polymorphism



Figur 2B

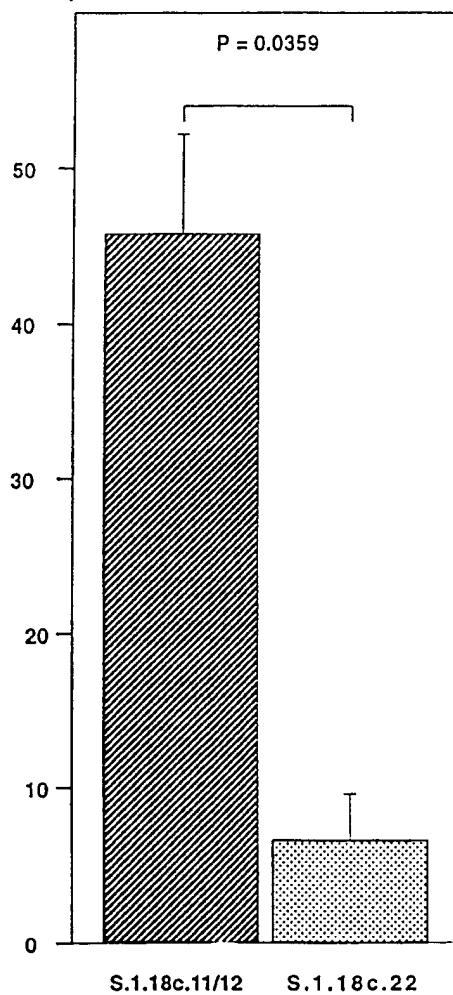


Figur 2A

**SREBP-1 Polymorphismus**  
(mmol/L)**A****SREBP-2 Polymorphismus**  
(mmol/L)**B****C****D****E****F**

Figur 3

Änderung der  
Gesamtcholesterinkonzentration  
nach Proteaseinhibitorbehandlung  
(in Prozent)



Figur 4

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; Miserez. André R.

<120> DNA-Polymorphismen in Stero-Regulator Element-Bindenden  
Proteinen

&lt;130&gt; Seq. Listing zu 02280PC

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;150&gt; CH 1277/99

&lt;151&gt; 1999-07-09

&lt;160&gt; 20

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (2)..(19)

&lt;400&gt; 1

g cac cta ggc aaa ggc ttc

His Leu Gly Lys Gly Phe

1

5

19

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

His Leu Gly Lys Gly Phe

1

5

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (2)..(19)

<400> 3

g cac cta ggg aaa ggc ttc

19

His Leu Gly Lys Gly Phe

1

5

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

His Leu Gly Lys Gly Phe

1

5

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

ctgctgccgc caacctaca

19

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Ala Ala Ala Ala Asn Leu Gln

1

5

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7





ctyctgccgg caacctaca

19

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 8

Ala Ala Ala Gly Asn Leu Gln

1

5

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Primer

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

&lt;400&gt; 9

ttattaataa tctgggtttt gtgtc

25

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Primer

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

&lt;400&gt; 10

gggaagagct aagttaaaag ttgtg

25

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 38

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Primer

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

&lt;400&gt; 11

cggaattctg aaattattta taatctgggt tttgtgtc

38

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 37

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Primer

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

&lt;400&gt; 12

cggaattcat cggggaagag ctaagttaaa agttgtg

37

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Primer

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

&lt;400&gt; 13

gccagtgacc attaacacct ttgga

25

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Primer

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

&lt;400&gt; 14

tcgtcttcaa agcctgcctc agtggctggc

30

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Primer

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

&lt;400&gt; 15

cggaattcgc cagtgaccat taacaccttt tga

33

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Primer

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

&lt;400&gt; 16

cggaattctg cagcaagcca gtcacagca gct

33

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Primer

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

<400> 17  
cggaattctg gtctcactgt gttttcactc atc 33

<210> 18  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

<400> 18  
cggaattcgc cagggctgac aagccttttc tca 33

<210> 19  
<211> 46  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

<400> 19  
gccagaggag attttgcagc tgctgccggc aacctacaaa cctgcc 46

<210> 20  
<211> 46  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

<400> 20  
ggcaggtttg taggttgccg gcagcagctg caaaatctcc tctggc 46



## CERTIFICATION

Schreiber Translations, Inc.

51 Monroe Street

Suite 101

Rockville, MD 20850

P: 301.424.7737

F: 301.424.2336

This is to certify that the attached English language document, identified as DNA POLYMORPHISMS IN STEROL REGULATOR ELEMENT BINDING PROTEINS, is a true and accurate translation of the original German language document to the best of our knowledge and belief.

Executed this 14<sup>th</sup> day  
of September, 2001

Schreiber Translations, Inc.  
51 Monroe Street, Suite 101  
Rockville, Maryland 20850  
ATA Member 212207

Schreiber Translations, Inc. uses all available measures to ensure the accuracy of each translation, but shall not be held liable for damages due to error or negligence in translation or transcription.



PCT

International Application Form [in English and French]

(12) INTERNATIONAL REGISTRATION PUBLISHED IN ACCORDANCE WITH THE CONTRACT ON  
INTERNATIONAL COOPERATION IN PATENT ISSUES (PCT)

(19) Worldwide Organization for Intellectual Property  
International Office

(43) International Publication Date  
January 18, 2001 (01/18/2001)

(10) International Publication Number  
PCT

WO 01/04352 A2

(51) International Patent Classification (IPC Class)<sup>4</sup>: C12Q 1/68

(21) International Reference Number: PCT/IB00/00918

(22) International Registration Date: July 7, 2000 (07/07/2000)

(25) Submission Language: German

(26) Publication Language: German

(30) Priority Information:  
4277/99 July 9, 1999 (07/09/1999) CH

(71) Applicant and

(72) Inventor: MISEREZ, André, R. [CH/CH]; St. Jakobstrasse 70,  
CH-4147 Aesch (CH).

(74) Attorney: E. BLUM & Co.: Vorderberg 11, CH-8044 Zurich (CH).

(81) Designated Countries (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA,  
BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,

CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ,  
TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated Countries (regional): ARIPO Patent (GH, GM,  
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian  
Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
European Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB,  
GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF,  
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Published**

- without international research report, to be  
republished upon receipt of the report.

*For explanations of the two-letter codes and other abbreviations  
we would like to refer to the explanations ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") at the beginning of each regular issue  
of the PCT bulletin.*

(54) Title: DNA POLYMORPHISMS IN STEROL REGULATOR ELEMENT BINDING PROTEINS

**(57) Abstract:**

The invention relates to DNA polymorphisms in sterol regulator element binding proteins (SREBP) that are characteristic of a higher risk of genetic diseases such as hypercholesterolaemia in humans. The corresponding polymorphisms, especially the polymorphisms of SREBP-1 and SREBP-2, are frequently observed in Alzheimer patients (SREBP-2). They are also characterized by a specific behavior in the therapy of HIV patients with protease inhibitors and appear to have an influence on the mortality.



Description



## **DNA Polymorphisms in Sterol Regulator Element Binding Proteins**

### **Reference to Appropriate Applications**

The present application claims priority of the Swiss application no. 1277/99 from July 9, 1999, whose disclosure is hereby included by referencing it.

### **Technical Field**

The present invention relates to polymorphisms, especially deoxyribonucleic acid (DNA) polymorphisms, in sterol regulator element binding proteins, particularly protein-1 (SREBP-1) and protein-2 (SREBP-2), and/or the usage of such polymorphisms for diagnostic purposes but also for active ingredient screening purposes.

### **State of the Art**

Over the last decades, long-term epidemiological studies have identified numerous factors that accelerate the creation of atherosclerosis and thus promote heart attacks. Despite avoiding environmental factors and behaviors that increase the risk of atherosclerosis, even younger adults can incur distinct atherosclerotic modifications all the way to heart attacks. In such cases, hereditary factors play a decisive role. It has been known, for example, that defects in genes that play an important role in the metabolism of cholesterol make treatment with cholesterol-lowering medication necessary. By detecting a genetic defect early on, timely countermeasures can be initiated.

It is therefore very desirable both from a diagnostic and a therapeutic point of view to be able to detect and identify important genetic changes (see A. R. Miserez, Die Bedeutung genetischer Faktoren bei der Entstehung des Herzinfarkts ["The importance of genetic factors for heart attacks"], *uni nova*, April 1998, p. 44-52).

Apart from its characteristic as a precursor of steroid hormones and bile acids, cholesterol is an essential component of the cell membranes that decisively influences the permeability of the latter. Human cells control their intracellular cholesterol content within tight limits by regulating the receptor-relevant absorption of extracellular, cholesterol-containing low density lipoprotein particles (LDL) and by controlling intracellular cholesterol biosynthesis. LDL particles bind to the LDL receptor (LDLR) through their apolipoprotein (Apo) B-portions. The binding and subsequent internalization of these lipoprotein receptor complexes can be interrupted partially or completely if one of the proteins that is involved in this process is defective or missing. The mutation of genes that encode the apolipoprotein E (mutations lead to familial dysbetalipoproteinaemia (FBL)), the apolipoprotein B-100 (mutations lead to familial defective Apo B (FDB)) as well as the LDL receptor (mutations lead to familial hypercholesterolaemia (FH)) results in an accumulation of cholesterol-containing particles in the plasma, which is associated with an increased risk of coronary heart disease. However, in the majority of the population that was examined, these mutations can explain only 4.2 to 7% of hypercholesterolaemia cases (defined as 10% of the population with LDLC concentrations above the 90<sup>th</sup> percentile). Consequently, the genetic defects that are the cause in the majority of people affected with increased plasma LDLC have not been identified.

The promoters of the LDLR gene as well as the genes that play a role in cholesterol biosynthesis, such as hydroxymethylglutaryl-(HMG)-CoA synthase, farnesyl-pyrophosphate synthase, and the squalene synthase genes, contain specific nucleotide sequences, the so-called sterol regulator elements (SRE).

It has also been known that two proteins, the SRE-binding proteins SREBP-1 and SREBP-2, bind to the SRE in the promoters of these genes and activate their transcription rate. In the case of a lack of sterols within the cell, both proteins are activated by two proteolytic steps, respectively, first in a sterol (and/or cholesterol) sensitive step and then in a sterol independent step. These proteolysis steps create 68 kDa large proteins from the NH<sub>2</sub> area of the SREBP-1 and SREBP-2 precursor proteins located in the cytoplasm. The mature form of transcription factors that is released on the amino end moves into the nucleus and binds to the SRE of the promoters of cholesterol-regulating genes. Subsequently, these genes are activated, leading to an increase in the receptor-enhanced absorption of LDL and to higher intracellular cholesterol biosynthesis.

As soon as cholesterol accumulates in the cell, the first cholesterol sensitive step is inhibited, the mature forms of SREBP disappear, and transcription rates decrease, thus preventing too large an accumulation of cholesterol in the cell. SREBP-1 and SREBP-2 regulate numerous SRE-containing genes that are involved in cholesterol homeostasis; SREBP-1 additionally activates HMB CoA reductase and squalene synthase. SREBP-1 and SREBP-2 are members of the so-called basic helix loop helix leucine zipper transcription factor family. The genes that encode these factors were recently cloned and characterized in their genetic structure (20, 21).

Despite all these findings, however—as already mentioned above—the number of recognizable patients at risk, e.g., for hypercholesterolaemia, is below 7%.

The goal of the present invention therefore consisted of improving early diagnosis and the therapy of patients at risk.

This goal was achieved by making diagnostic methods available as well as suitable polymorphisms on the SREBP genes for executing these methods, in particular polymorphisms that occur in some patients with changes to the lipid environment, especially the cholesterol environment, preferably in a large portion of such patients.

#### Description of the Invention

One object of the present invention is therefore a method for detecting an increased or reduced risk of disease and/or mortality and/or an increased or reduced sensitivity to therapeutic methods and/or their side effects.

Further objects of the present invention include the usage of polymorphisms for diagnostic purposes, for evaluating treatments for diseases and active ingredient screening, and for making suitable polymorphisms available.

Surprisingly, it was found that polymorphisms on sterol regulator element binding proteins (SREBP), particularly SREBP-1 and SREBP-2, are indicators of health and/or therapy risks. The invented method is therefore characterized by the fact that upon the sampling of blood and/or tissue the blood and/or tissue is examined for the existence of a polymorphism in at least one SREBP, wherein the existence of a polymorphism can be determined on an amino and/or nucleic acid level. The term polymorphism, as it is used

within the framework of this invention, describes any sequence variation occurring naturally in humans, preferably a sequence variation that occurs in a large portion of the population.

In a preferred method—the so-called microarray (DNA chip) technology—appropriate nucleic acid sequences that display a characteristic polymorphism, particularly a polymorphism of SREBP-1 and/or SREBP-2, are employed on a DNA and/or RNA chip. Other methods include, e.g., PCR and subsequent restriction enzyme digestion, such as with *Msp* I and/or *Xmn* I; “Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)” methods; “Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)” methods; “Protein Truncation Test (PPT)” methods; “Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP)” methods; “Cleavage Fragment Length Polymorphisms (CFLP)” methods; “Chemical Cleavage of Mismatches” methods; sequencing; mini-sequencing (snapshot sequencing); methods based on “High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)”; dot blot methods (allele-specific oligonucleotides); allele-specific PCR methods (allele-specific oligonucleotides); “Real Time” quantitative PCR spectrophotometry (e.g., *TaqMan*<sup>™</sup>, Light Cycler<sup>™</sup>); and “Luminescent non-gel based molecular interrogation”.

The polymorphisms that are of particular interest within the framework of this invention, particularly those that were found on the SREBP-1 and SREBP-2 genes, involve changes in the functionality of the protein. In the presence of the mutations in the SREBP-1 and SREBP-2 gene, which are described in more detail below, the LDL receptor gene is activated less or more, for example, leading to changed cholesterol levels in humans.

Furthermore, it was found within the framework of the present invention that corresponding polymorphisms are indicators of an increased or reduced risk for disease, especially of an

increased or reduced risk for contracting hypercholesterolaemia or Alzheimer's. They also enable an evaluation of the risk of problems that may occur during HIV therapy, particularly therapy with protease inhibitors, and allow the risk to be estimated for developing a disease that is associated with a higher risk of mortality, even independent of a possibly associated cholesterol modification or Alzheimer's disease.

The invention is described more closely below and in the figures.

#### Brief Description of Figures

Figure 1A depicts a chromatogram for identifying the exon polymorphism in SREBP-1 and the determined polymorphism, i.e., a mutation in the SREBP-1 gene (Exon 18c) on amino acid position 1028 (G1028G), which does not lead to any amino acid exchange but generates an *Xmn* I restriction interface.

Figure 1B shows a chromatogram for identifying the exon polymorphism in SREBP-2 and the determined polymorphism, i.e., a mutation in the SREBP-2 gene (Exon 10) on amino acid position 595 (A595G), which leads to an amino acid substitution (alanine for glycine) and generates an additional *Msp* I restriction interface.

Figure 2A shows how through PCR amplification of the entire exon 18c (SREBP-1) and the subsequent restriction enzyme digestion homozygote and heterozygote carriers of the corresponding mutation can be identified when screening large human populations with high throughput.

Figure 2B shows how through PCR amplification of the 5' end of exon 10 (SREBP-2) and the subsequent restriction enzyme digestion homozygote and heterozygote carriers of

the corresponding mutation can be identified when screening large human populations with high throughput.

Figure 3 shows the comparison between carriers and non-carriers of polymorphisms for SREBP-1 and SREBP-2 with regard to the corresponding average, overall cholesterol concentrations and the gene-gene interactions with the apolipoprotein E-gene.

Figure 4 shows the percentage change in plasma cholesterol level before and after the administration of protease inhibitors in dependence of the G1028G polymorphism.

#### Ways of Executing the Invention

Polymorphisms in the SREBP genes can generally be determined, as described below for the SREBP-1 and SREBP-2 genes.

Special polymorphisms can be determined, for example by designing oligonucleotides that correspond to the intron sequences of the SREBP-1 and SREBP-2 genes adjacent to the exon/intron limits, and by testing both genes for sequence variations through the single strand conformation polymorphism method (SSCP).

The following polymorphisms, which occur relatively frequently and are compared to the normal gene, were found this way, wherein NS represents the nucleotide sequence and AS the amino acid sequence:

#### **SREBP-1 (wild type):**

NS G CAC CTA GGC AAA GGC TTC (seq. id. no. 1)

AS H L G K G F (seq. id. no. 2)

#### **SREBP-1 Exon 18c Polymorphism (SREBP-1 G1028G or SREBP-1c-G1028G):**

NS G CAC CTA GGG AAA GGC TTC (seq. id. no. 3)

AS H L G K G F (seq. id. no. 4)

**SREBP-2 (wild type):**

NS CT GCT GCC GCC AAC CTA CA (seq. id. no. 5)

AS A A A A N L Q (seq. id. no. 6)

**SREBP-2 Exon 10 Polymorphism (SREBP-2 A595G):**

NS CT GCT GCC GGC AAC CTA CA (seq. id. no. 7)

AS A A A G N L Q (seq. id. no. 8)

Similarly, another SREBP-2 polymorphism, which has meanwhile been published within the framework of a dissertation, was detected with a relatively high frequency (see dissertation of the Research Department, University Hospital of Basel, by Patrick Y. Müller, "Sterol Regulatory Element Binding Protein 2:..."), which subsequently is described as SREBP-2-exon-6 polymorphism or SREBP-2-R371K.

A comparison between the sequence of the wild type and this additional polymorphism shows a mutation at the protein stage, i.e., mutation of an arginine (R) to a lysine (K) on position 371 (R371K) in exon 6:

**SREBP-2 (wild type):**

NS CTG AGG AAG

AS L R K

**SREBP-2 Exon 6 Polymorphism (SREBP-2 R371K):**

NS CTG AGG AAG

AS L K K

As the above sequences show, each of the three polymorphisms exhibits a mutated nucleic acid in the exon area, wherein only two of the three polymorphisms, i.e., those to SREBP-2, display a mutation that affects the protein level (see Figure 1A, Figure 1B).



However, all three polymorphisms lead to new interfaces for restriction enzymes, i.e., in the SREBP-1 to one for *Xmn* I and in the SREBP-2 to one for *MSP* I and/or one for *Dde* I.

Of course, the corresponding polymorphisms also exist in the complementary strands so that within the framework of the present invention the corresponding disclosure includes the complementary sequences whenever reference is made to nucleotide sequences.

Since the polymorphism in the SREBP-1 gene does not lead to a mutation on a protein level, but nevertheless can be correlated to the occurrence of hypercholesterolaemia, we can conclude that this polymorphism involves one or more mutations in the same gene or exercises influence on the RNA level. This assumption is in agreement with the fact that for the polymorphism detected in SREBP-1, a connection is found not only with the occurrence of hypercholesterolaemia, but also with a lack of increase in the overall cholesterol and triglyceride concentrations in HIV patients upon administration of protease inhibitors. This polymorphism is therefore a valuable aid when estimating the risk of the occurrence of undesirable effects and when adjusting a treatment with protease inhibitors.

Another important characteristic of the present polymorphisms that are described here, particularly of the SREBP-2-A595G polymorphism, is its predominance in patients with Alzheimer's in comparison to its occurrence in the general population, i.e., 7% among Alzheimer patients compared to 2.4% in the general population.

Surprisingly, it was found additionally that all three polymorphisms described in more detail above significantly influence the mortality of their carrier.

In summary, it should therefore be noted that SREBP-2-A595G is specially suited for providing information about the risk of cholesterol increases as such, while SREBP-1c-G1028G is particularly suited as a prognostic indicator for individual reactions (risk of cholesterol increase) upon the administration of medication. For information about the risk of the development of Alzheimer's disease (also independent of a possibly associated cholesterol increase or decrease) SREBP-2-A595G is preferred, while all three polymorphisms that are explained in detail above are suited for determining the risk of developing a disease that is associated with an increased mortality risk (also independent of a possibly associated cholesterol modification or Alzheimer's disease), wherein SREBP-2-A595G and SREBP-1c-G1028G are preferred.

While in general polymorphisms of the SRBEP are suited for the method, those of SREBP-1 and/or SREBP-2 are preferred, particularly polymorphisms that lead to an increased or reduced activation of genes in lipid metabolism, especially in cholesterol metabolism. Polymorphisms that lead to an increased or reduced plasma concentration of at least one lipid, especially of cholesterol, are also preferred.

It has been shown that a polymorphism that exhibits a recognition sequence for an interface within the polymorphism is particularly suited for a method when employing this recognition sequence. Such recognition sequences are, e.g., the recognition sequence for *Xmn* I or *MSP* I, i.e., GAANNNTTC or CCGG, wherein N can be a random nucleotide. Sequences that contain such recognition sequences are, e.g.:

SREBP-1, Exon 18c: GCACCTAGGGAAAGGCTTC, (seq. id. no. 3) and

SREBP-2, Exon 10: CTGCTGCCGGCAACCTACA (seq. id. no. 7).

These sequences can be used as such or together with additional nucleotides from their natural environment, e.g., as probes. Apart from that, additional suited sequences of course exist, such as the following nucleic acid sequence, possibly together with further nucleotides from the natural environment of this sequence, i.e.,

SREBP-2, Exon 6: CTGAAGAAG.

A preferred method on the nucleic acid level is characterized by the fact that after the sampling of blood and/or tissue and DNA extraction, at least a fragment of a sequence, especially of an exon, an SREBP that contains a polymorphism, is amplified by employing two oligonucleotide sequences, wherein the polymorphism is characteristic of an increased or reduced activation of genes in lipid metabolism, especially in cholesterol metabolism, and particularly preferred for an increased or reduced risk of hypercholesterolaemia in humans, and that the amplification product is subjected to a digestion process with suitable restriction enzymes or a denaturation process and that the digestion and/or denaturation products are separated electrophoretically.

If the polymorphism is in an exon, preferably at least one of the oligonucleotide sequences is located in the intron area adjacent to the exon in which the polymorphism exists, such as the following pairs

S1.18cF (seq. id. no. 9):

5'-TTATTATAATCTGGGTTTTGTGTC-3' and

S1.18cR (seq. id. no. 10):

5'-GGGAAGAGCTAAGTTAAAAGTTGTG-3' or

*EcoR* I.S1.18cF (seq. id. no. 11):

5'-CGGAATTCTGAAATTATTTATAATCTGGGTTTTGTGTC-3' and

*EcoR* I.S1.18cR (seq. id. no. 12):

5'-CGGAATTCATCGGGGAAGAGCTAAGTTAAAAGTTGTG-3' or

S2.10P.F (seq. id. no. 13):

5'-GCCAGTGACCATTAACACCTTTTGA-3; and

S2.10P.R. (seq. id. no. 14):

5'-TCGTCTTCAAAGCCTGCCTCAGTGGCTGGC-3' or

*EcoRI* S2.10F (seq. id. no. 15):

5'-CGGAATTCGCCAGTGACCATTAACACCTTTTGA-3' and

*EcoRI* S2.10R (seq. id. no. 16):

5'-CGGAATTCTGCAGCAAGCCAGTCATCAGCAGCT-3'

*EcoRI* S2.6F (seq. id. no. 17):

5'-CGGAATTCTGGTCTCACTGTGTTTTCACTCATC-3'

*EcoRI* S2.6R (seq. id. no. 18):

5'-CGGAATTCGCCAGGGCTGACAAGCCTTTTCTCA-3'.

Apart from the above-mentioned sequences and/or sequence pairs, other sequences and/or sequences pairs can be used as well, such as sequences that can be hybridized with the above sequences under stringent conditions, including sequences without and/or with other recognition sequences than the above-described *EcoRI* sequence. The overall length of such sequences is generally 15 to 30 bases.

Suitable polymorphisms can be determined by amplifying and analyzing an SREBP sequence of interest, by comparing the exon areas of this sequence of interest with the exon areas of the sequence of the type of the corresponding SREBP occurring most frequently in the population, and by examining the sequences with detected differences for malfunctions, wherein preferably the differences lead to another amino acid and/or especially to a recognition area for a restriction enzyme. Such a recognition area is preferably located in an exon; however, it can also be located in an intron and, e.g., lead to a splicing variation.

The great influence of polymorphisms on factors that have an effect on the clinical picture

is discussed briefly in the following based on polymorphisms A595G and G1028G, which occur more frequently.

The A595G mutation in the SREBP-2 gene is associated with a significant modification of average plasma cholesterol concentrations. The amino acid sequence that corresponds to the published cDNA sequence (12, 15, 16) was defined as a wild type, although—at least in the presently examined Swiss population universe—the sequence that encodes glycine on position 595 had a much higher prevalence than the published alanine at this location. Over 93% of all individuals were heterozygote or homozygote carriers of the A595G mutation. Both genes were sequenced (17) from a cDNA library, deduced from HeLa cells derived from the carcinoma of an African American woman (Henriette Lacks). Direct testing with HeLa cells showed homozygosity with regard to the not mutated A595A genotype and allowed the assumption that this person was a homozygote carrier of the allele wild type—a condition that was, however, detected only in 6.69% of the Swiss population collective. The observation of a high prevalence of the A595G mutation led, within the framework of the present invention, to the assumption that the rare wild type in the homozygote form (11) was associated with a higher plasma cholesterol concentration and the not mutated form (22) with a lower concentration and that an autosomal-recessive effect could thus exist; therefore, allele combinations 11 and 12/22 were compared to each other.

The population of the individuals that were included was heterogeneous with regard to overall plasma cholesterol concentrations, which ranged from 1.95 to 22.65 mmol/L. This wide range can be explained by the inclusion of random samples, but also selective populations, and consequently normocholesterolaemic and hypercholesterolaemic individuals. It was therefore not surprising that without stratification of the collective into

randomly/non-randomly selected or into normocholesterolaemic/hypercholesterolaemic sub-groups, the effect of at least one of the polymorphisms, that of the G1028G polymorphism, did not achieve any statistical significance ( $P=0.0770$ ). However, as soon as these selection criteria were included in the calculations, the difference between G1028G allele combinations 11/12 and 22 was significant ( $P=0.0164$ ). Furthermore, with the A595G mutation the probability was reduced that differences in the overall plasma cholesterol concentrations between allele combination 11 and 12/22 were based on coincidence, i.e., from  $P=0.0003$  (unpaired t-test, no stratification) to  $P<0.0001$  (variance analysis = ANOV, stratification).

Beyond that, in the case of both polymorphisms the association between a certain allele combination and higher plasma cholesterol concentrations (allele combination 22 for G1028G polymorphism, allele combination 11 for A595G polymorphism; shown in black in Figure 3, E and F) was higher in the presence of the R158C ( $\epsilon 2$  phenotype) polymorphism and lower in the absence of the C112R ( $\epsilon 4$  phenotype) polymorphism in the Apo E gene. It was found that these gene-gene interactions considerably influence the association of the G1028G-polymorphism (22 allele combination) with higher plasma cholesterol concentrations: When excluding the carrier of the C112R mutation, the effect of the G1028C  $\rightarrow$  G mutation in the homozygote form (22) was highly significant ( $P=0.0002$ ).

It was therefore possible to prove that both SREBP genes modify the plasma cholesterol concentrations in humans in a way that is similar to the familiar effects of the two polymorphisms in the Apo E gene (C112R and R158C). Furthermore, gene-gene interactions became apparent when the SREBP-1 and -2 gene polymorphisms were correlated to the polymorphisms in the Apo E gene.

In 11.6% of individuals with secondary hyperlipoproteinaemia, plasma triglyceride concentrations were elevated. One effect of elevated triglyceride concentrations was

underlined by the fact that if individuals with elevated triglyceride concentrations were excluded, the A595G mutation showed a significant effect on male individuals with diabetes mellitus ( $P=0.0018$ ), while this effect did not occur when individuals with elevated triglyceride concentrations were included.

The A595G mutation in the SREBP-2 gene could therefore be closely associated with a different kind of mutation as well as directly affect the division rate of the protein. Although exon 10, where the A595G mutation is located, is not part of the mature protein that travels into the nucleus, this part of the protein is, nevertheless, connected with the activity of the protein in that it influences the division processes that activate the SREBP-2 precursor form.

Proteolysis is initiated by an enzyme that recognizes a highly preserved RXXL sequence of the SREBP precursor forms, which is located in the hydrophilic cycle. With a first proteolysis step, the  $\text{NH}_2$  terminus and the COOH terminus domains are separated. After this first sterol sensitive step, the remaining membrane bound  $\text{NH}_2$  terminus fragment is released by a second sterol independent step. The second proteolysis step (site-2) is located within the membrane-covering area and is conveyed by the site-2 enzyme. The second step takes place only after site-1 proteolysis has occurred. A prerequisite for site-1 proteolysis, however, is the formation of a complex from SREBP and the so-called SREBP cleavage activating protein (SCAP). In the case of a lack of sterols in the cell, this protein binds to the COOH terminus domain. The formation of the SREBP-SCAP complex is decisive for the site-1 proteolysis step and dependent upon the completeness of the COOH terminus domains from SREBP-2 and SCAP (18, 19). On the basis of the experiments that were recently conducted by Sakai et al. (18), who identified the SREBP

precursor forms as a regulatory unit, the mutation in this domain, which causes a significant reduction in the average plasma cholesterol concentrations, gives rise to the question as to whether a slightly simplified formation of the SREBP-SCAP complex is possible when the A595G mutation exists.

The effect of the G1028G polymorphism appears to be influenced by gene-gene interactions with the Apo E gene. Contrary to the G1028G mutation in the SREBP-1 gene, the A595G mutation in the SREBP-2 gene has significant effects as an indicator on the plasma cholesterol concentrations both when examining the entire collective and when analyzing the various sub-groups. It is likely that the mutation shows its effect by influencing the division process responsible for the sterol-dependent activation of SREBP-2 directly.

The above embodiments show that both genes modify the individual plasma cholesterol concentrations significantly. Although many genes play a role in intra- and extracellular cholesterol metabolism, so far only the Apo E gene has provided any larger benefit as a modifying gene with regard to the general population. Other genes that are involved in lipoprotein metabolism, such as the LDL receptor gene, the Apo B-100 gene, or another unknown gene on the 1p34.1-p32 chromosome, can have a considerable effect on overall plasma cholesterol concentrations in the mutated state. These mutations, however, are very rare compared to the polymorphisms in the Apo E gene and the recently discovered polymorphisms in the SREBP-1 and SREBP-2 genes. Even the R3'500Q mutation, which with 209 affected individuals among the general population (in Switzerland) so far has the highest observed prevalence, does not occur frequently enough to examine the influence of a certain gene on the cholesterol metabolism of the general population based on this polymorphism.



The methods and polymorphisms of the present invention are therefore very valuable aids for the early detection of patients at risk as well as for the optimization of prophylaxis and therapies. Furthermore, they are suited as targets for screening active ingredients, and they are suited for evaluating a therapy for diseases, such as HIV. The value of the preferred polymorphisms of this invention lies also with the availability of recognition sequences in proximity to the polymorphism. These recognition sequences are in SREBP-1 the recognition sequence for *Xmn* I, i.e., GAANNNTTC, wherein N can be a random nucleotide, and in SREBP-2 the recognition sequence for *Msp* I, i.e., CCGG.

The present invention also relates to a method for detecting risk carriers as well as aids for this method, such as oligonucleotide sequences for the amplification of DNA sections of interest.

A preferred method for detecting risk carriers is characterized by the following steps:

1. Sampling of blood or tissue
2. DNA extraction
3. Amplification with suitable primer
4. Digestion with suitable restriction enzymes or denaturation of the PCR product
5. Electrophoretic division with suitable gel.

The digestion process with suitable restriction enzymes is used in particular for the detection of special polymorphisms of interest, and the denaturation process (single-strand conformation polymorphism = SSCP) allows the detection of additional mutations.

A preferred oligonucleotide sequence for amplifying a DNA section that corresponds to an exon area in which a polymorphism exists is characterized by the fact that it is located in an intron area that is adjacent to the exon in which the polymorphism exists and is located in proximity to the exon/intron border or in the exon itself if this allows the number of interfaces to be reduced.

Preferred oligonucleotides for the SRBEP-1 polymorphism are the oligonucleotides S1.18cF (seq. id. no. 9): 5'-TTATTTATAATCTGGGTTTTGTGTC-3' and S1.18cR (seq. id. no. 10): 5'-GGGAAGAGCTAAGTTAAAAGTTGTG-3', which also permit the detection of splicing mutations, as well as oligonucleotides, which contain additional *EcoR* I interfaces, such as *EcoR* I.S1.18cF (seq. id. no. 11): 5'-CGGAATTCTGAAATTATTTATAATCTGGGT-TTTGTGTC-3' and *EcoR* I.S1.18cR (seq. id. no. 12): 5'-CGGAATTCATCGGGGAAGAGC-TAAGTTAAAAGTTGTG-3'. In order to amplify the exon 10 of the SREBP-2 gene, including its exon/intron borders, the oligonucleotides S2.10P.F (seq. id. no. 13): 5'-GCCA-GTGACCATTAACACCTTTTGA-3' and S2.10P.R. (seq. id. no. 14): 5'-CGGAATTCGCC-AGTGACCATTAACACCTTTTGA-3' and *EcoRI* S2.10R (seq. id. no. 16): 5'-CGGAATTC-TGCAGCAAGCCAGTCATCAGCAGCT-3' are preferred.

A special application of SREBP polymorphisms relates to their usage on so-called DNA or gene chips. Methods that employ such chips, which enable the simultaneous detection of various genetic defects, are described in literature. For example, information is available from Affymetrix about their GeneChip™ systems and can also be found in articles in trade magazines such as those by Mark Chee et al., *Accessing Genetic Information with High-Density DNA Arrays*, Science Vol. 274, pages 610-4, (1996) and David G. Wang, *Large-Scale Identification, Mapping, and Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms in the Human Genome*, Science Vol. 280, pages 1077-82, (1998).

The method can be summarized briefly as follows: Through photolithography, specific areas of a wafer are fed gradually to the chemical DNA or RNA single-strand synthesis, wherein the protective film is newly applied after each step of the synthesis and subsequently removed only selectively in those areas where a certain nucleotide is supposed to be introduced. This procedure allows the creation of areas that are selective for certain polymorphisms. In order to make hybridizations with target sequences visible, common marking methods can be used, e.g., light-emitting marking of the fragments in the sample, such as biotinylation and detection with streptavidin, as well as fluorescence marking.

By removing marked, non-hybridizing fragments, hybridizations become visible on the chip directly or after additional treatment. Of course, the individual steps of this method can be varied, e.g., as far as the time of the marking process or the type of marking is concerned. Such variations are obvious to the expert.

A chip that is suited for the early detection of patients with an increased risk of hypercholesterolaemia contains, apart from the regular SREBP-1 and SREBP-2 sequences, the corresponding polymorphisms that are the object of the present invention. Apart from these SREBP-1 and SREBP-2 analysis aids, of course corresponding sequences for additional polymorphisms characteristic of hypercholesterolaemia can also exist, i.e., FH, FDB, and FDL.

Naturally, an appropriate chip can also be used for diagnosing other diseases that show a dependency upon SREBP-1 and/or -2, such as Alzheimer's disease, or it can be designed for the simultaneous diagnosis of several diseases or risk factors by applying characteristic

polymorphisms for the diseases or risks of interest. Sequences that are of interest in this respect are, e.g., sequences from the following group (preferred sequences are underlined) when studying cardiovascular risks:

11 $\beta$ -hydroxylase aldosterone synthase gene, 11 $\beta$ -hydroxysteroid-dehydrogenase (HSD11K) gene, 17 $\alpha$ -hydroxylase (CYP17A) gene, 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG) coenzyme A reductase gene, 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG) coenzyme A synthase gene, acyl coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase gene, acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase (ACAT)-1 gene, alpha-1-antichymotrypsin gene, alpha-1-trypsin gene, alpha-galactosidase A gene, alpha-L-iduronidase (IDUA) gene, alpha-lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) gene, alpha-synuclein gene, angiotensin gene, angiotensin II type 1 receptor gene, angiotensin-converting enzyme gene, antitrypsin gene, apolipoprotein (a) gene, apolipoprotein AI-CIII-AIV gene cluster, apolipoprotein B-100 gene, apolipoprotein CI gene, apolipoprotein E (epsilon 2) gene, apolipoprotein E (epsilon 4) gene, apolipoprotein E receptor 2 gene, benzodiazepine receptor gene, CD-36 gene, cholesterol 24-hydroxylase gene, cholesteryl ester transfer protein (CETP) gene, cystathionine- $\beta$ -synthase gene, cystatin C gene, cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage enzyme gene, epithelial Na-channel ( $\beta$ -subunit) gene, farnesyl-pyrophosphate (PP) synthase gene, fibrinogen gene, glucokinase gene, GLUT1 glucose transporter gene, hepatic lipase gene, high density lipoprotein (HDL) receptor gene, homogentisic acid oxidase gene, hormone-sensitive lipase gene, iduronate-2-sulfatase gene, interleukin-8 gene, lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) gene, lipooxygenase gene, lipoprotein lipase gene, low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) gene, low density lipoprotein receptor gene, lysosomal acid lipase gene, macrophage scavenger receptor (SR-A) gene, macrophage scavenger receptor (SR-BI) gene, methylene-tetrahydrofolate

reductase gene, microsomal triglyceride transfer protein (MTP) gene, NF- $\kappa$ B gene, Niemann-Pick C1 protein gene, oxysterol binding protein (OSBO) gene, paraoxonase-1 gene, paraoxonase-2 gene, peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha gene, peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) beta gene, peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma gene, plasminogen activator-inhibitor-1 gene, site-1 protein (S1P) gene, site-2 protein (S2P) gene, squalene synthase gene, SREBP cleavage-activating protein (SCAP) gene, steroid acute regulatory protein (StAR) gene, steroid-11 $\beta$ -hydroxylase (CYP11B1) gene, sterol-27-hydroxylase gene, sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1a gene, sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1c gene, sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-2 gene, very low density lipoprotein (VLDL) receptor gene.

For studying neurological risks, for example, a chip that comprises sequences from the following group is favorable (preferred sequences are underlined):

A-beta precursor gene, adenosine monophosphate deaminase gene, alpha 2-monoglobulin gene, alpha-1-antichymotrypsin gene, alpha-1-trypsin gene, alpha-2 macroglobulin gene, alpha-ketoglutarate dehydrogenase gene, amyloid beta-protein precursor gene, amyloid precursor protein gene, amyloid precursor-like protein 1 gene, amyloid precursor-like protein 2 gene, antitrypsin gene, apolipoprotein (a) gene, apolipoprotein AI-CIII-AIV gene cluster, apolipoprotein E (epsilon 2), apolipoprotein E (epsilon 4), apolipoprotein E gene, apolipoprotein E receptor 2 gene, Bcl-2 gene, beta-amyloid precursor protein gene, beta-nerve growth factor gene, calbindin-D gene, catpase gene, cathepsin D gene, CD36 gene, clusterin gene, cyclooxygenase-2 gene, cystatin C gene, cytochrome C oxidase 1 gene, cytochrome C oxidase 2 gene, cytochrome oxidase gene, dihydrofolate reductase gene, dihydrolipoylsuccinyltransferase (DLST) gene, endopeptidase 1 gene, estrogen-Bcl xL gene, Fe65L2 gene, gamma-synuclein gene,

gelsolin gene, GLUT1 glucose transporter gene, GLUT4 glucose transporter gene, glutamic acid decarboxylase gene, glutathion S-transferase gene, HLA-A2 gene, interleukin-1 gene, interleukin-6 gene, interleukin-8 gene, L-3-hydroxyacyl-coenzyme dehydrogenase gene, lipooxygenase gene, low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) gene, low density lipoprotein receptor gene, macrophage scavenger receptor (SR-A) gene, macrophage scavenger receptor (SR-BI) gene, methylene-tetrahydrofolate reductase gene, myeloperoxidase gene, NF- $\kappa$ B gene, Niemann-Pick C1 protein gene, non-A-beta component for amyloid (NAC) peptide gene, Notch gene, ornithine transcarbamylase gene, presenilin 1 gene, presenilin 2 gene, prion protein gene (PRNP), prostaglandin E2 gene, serotonin gene, serotonin transporter gene, site-1 protein (S1P) gene, site-2 protein (S2P) gene, SREBP cleavage-activating protein (SCAP) gene, sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1a gene, sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1c gene, sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-2 gene, superoxide dismutase gene, Tau (protein) gene, very low density lipoprotein (VLDL) receptor gene, X11alpha protein gene, X11L2 gene.

Furthermore, the polymorphisms, methods, and chips of the present invention are also suited for determining relevant risk patients for treatment with specific medication, such as a treatment with protease inhibitors in HIV-infected patients.

The present invention will now be explained in more detail with the help of examples. However, the invention is not limited to the example described in the experiment section and/or the embodiment mentioned in them explicitly.

## **Experimental Section**

### **Advance Remarks**

The polymorphisms were determined by synthesizing oligonucleotides into intron sequences in the exon/intron border area so that relevant splicing variations could be detected as well. The following describes the exact procedure for detecting the presently relevant polymorphisms as well as examining them in detail.

### **Probands**

Overall 3,078 people were included in the study. DNA polymorphisms and rare mutations in five different genes were examined. In all groups individuals with TC plasma concentrations below the 90<sup>th</sup> percentile, standardized by age and sex, were considered normocholesterolaemic (NC); individuals with TC plasma concentrations above the 90<sup>th</sup> percentile were considered hypercholesterolaemic (HC). The study included 1,685 probands from various prospectively examined random samples. It involved 630 individuals from the "Swiss PREvalence for Apolipoprotein Defects" (SPREAD) study, a large, cross-sectional examination which included unrelated male individuals from the German-, French- and Roman-speaking parts of Switzerland who were recruited for military service. An additional 324 individuals were included from the interdisciplinary age study (IDA). Another 413 older individuals, who were examined for a suspected impairment of their memory functions but not for hypercholesterolaemia, were included. These individuals from the Basel Memory Clinic (BMC) were used as an additional control collective in the study. The study included 318 affected and/or unaffected individuals

from the “Study to Investigate the Molecular Basis of Hypercholesterolemia in Switzerland in Hyperlipidemic Individuals by Pedigree Analysis” (SIBSHIP), a sub-study of the Swiss MED PED (Make Early Diagnosis – Prevent Early Death) program, a multi-national study under the patronage of the WHO. The study also included 871 individuals from collectives with assumed primary and secondary hyperlipoproteinaemia. The molecular diagnosis was based on the identification of the underlying mutation (familial defective Apo B (FDB), familial dysbetalipoproteinaemia (FDL), familial hypercholesterolaemia, diagnosed with molecules (FHM) or through cosegregation analysis (FHM)). The clinical diagnosis of familial types of hypercholesterolaemia is based on overall and/or LDL cholesterol values above the 90<sup>th</sup> percentile and a familial anamnesis with at least two additional family members with hypercholesterolaemia. Individuals with families with these characteristics and triglyceride values < 3.7 mmol/L and/or tendon xanthomas were clinically diagnosed and classified as familial hypercholesterolaemia (FHC). Families with individuals without xanthomas as well as triglyceride values  $\geq$  3.7 mmol/L were considered familial-combined hyperlipidaemia (FCH). A total of 298 people came from the “Study on the molecular basis of Triggers Activating a Rise in Triglycerides and cholesterol in Endocrinological and Renal Diseases” (STARTER). A collective of 130 people with biochemically confirmed diabetes mellitus (plasma glucose values with empty stomach > 7.8 mmol/L) (DIA), 78 individuals with hypothyroidism and 14 individuals with kidney insufficiencies (creatinine clearance < 50 ml/min) (RIN) were included in the study. For all people, at least information such as age, sex and overall cholesterol concentrations without lipid-lowering treatment and the clinical and/or molecular biological diagnosis was recorded. With the exception of the



SPREAD study, the persons were also characterized clinically in detail. In the IDA, BMC, SIBSHIP and STARTER studies information such as size, weight, body mass index, blood pressure, the existence or lack of clinical indications of hypercholesterolaemia (tendon xanthomas, xanthelasmas, and arcus lipoides), and indications and symptoms of coronary heart disease, cerebrovascular diseases, and peripheral-arterial disease as well as biochemical parameters such as plasma concentrations of overall cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides and thyroid-stimulating hormone (TSH) was determined. The documentation also contained the personal anamnesis of coronary heart disease, cerebrovascular disease, peripheral-arterial clogging, thyroid disease, diabetes mellitus, the extent of alcohol and cigarette consumption (in packs, years) and, in the SIBSHIP and STARTER studies, a detailed family history with additional lipoprotein analyses (e.g., lipoprotein (a) [Lp(a)], apolipoprotein B etc.). In all these people the samples were placed under anonymity for further testing.

### Material

During the examination *Thermus aquaticus* DNA polymerase and desoxynucleotides from Perkin Elmer Cetus Corporation (Norwalk, CT, USA) and from Qiagen (Milden, Germany) were used. The restriction endonucleases came from New England Biolabs Inc. (Beverly, MA, USA), and the precolored protein molecular weight indicator and DNA molecular weight indicator came from Roche Diagnostics (Basel, Switzerland). The oligonucleotides that were used were synthesized by Microsynth Inc. (Balgach, Switzerland). The DNA was amplified in 200 µl reaction containers through PCR equipment from Perkin Elmer (GeneAmp® PCR System 9700) and Stratagene (RoboCycler® Gradient 96 temperature

cycler, Stratagene, La Jolla, CA, USA). We used agarose from BioRad (Irvine, CA, USA) and polyacrylamide (acrylamide:bisacrylamide 37.5:1) from Oncor Inc. (Gaithersburg, MD, USA). Precast GMA™ Wide Mini S-50 gels and Spreadex EL 300 Wide Mini S-100 gels were purchased from Elchrom Scientific (Cham, Switzerland). Precast gels for the polyacrylamide gel electrophoresis (Ready Gels 10%) came from BioRad. [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP and Hybond-C extra-nitrocellulose membranes came from Amersham International (Buckinghamshire, UK). DH5 $\alpha$  bacteria and 1kb DNA conductors came from GIBCO BRL, Life Technologies (Paisley, UK); QIAmp 96 DNA blood kits, genomic tip kits, QIAquick extraction and PCR purification kits, QIAprep Spin Miniprep kits, and QIAGEN Plasmid Mini Kits came from Qiagen.

### Methods

The individuals included in the study were tested for two familiar DNA polymorphisms in the apolipoprotein E gene, which both affect an amino acid exchange (C112R, R158C), a DNA mutation in the apolipoprotein B-100 gene occurring in the Swiss population with high prevalence that causes an amino acid exchange (R3'500Q), for a new DNA polymorphism in the SREBP-1 gene (G1028G), which does not lead to an amino acid exchange, and for a new polymorphism in the SREBP-2 gene, which leads to an amino acid exchange (A595G). A subgroup of these people where additional family members with hypercholesterolaemia were examined (SIBSHIP study) was examined for the existence of DNA restriction fragment length polymorphisms in the LDL receptor gene, which permitted the execution of cosegregation studies used to confirm LDL receptor defects. Individuals from the SIBSHIP study were also tested systematically for mutations in the LDLR gene.

## 1. Lipoprotein Analyses

Blood samples on empty stomach were taken from all people that were included in the study. Lipid and lipoprotein analyses were performed at the central laboratory of the Basel University Teaching Hospitals, with the exception of one sub-group from the SIBSHIP study with familial types of hyperlipoproteinaemia which had already been treated upon inclusion in the study and where a wash-out period was not conducted for ethical considerations. In this patient sub-group, the overall cholesterol concentrations were determined at the central lab before starting the treatment with medication (pretreatment TC) or information about the overall cholesterol concentrations, which in part had been determined in other laboratories before treatment, was obtained by the treating family physicians and included in the analyses. LDL cholesterol (LDLC) was precipitated with heparin (Merck, Darmstadt, Germany) and calculated with the Friedewald formula. HDL cholesterol (HDLc) was precipitated with phosphotungstic acid and magnesium ions (Roche Diagnostics). Overall cholesterol (TC), LDLC, and HDLC plasma concentrations were measured with the help of enzymatic colorimetric cholesterol 4-aminophenazone (PAP) method from Roche Diagnostics on a Hitachi analyzer, model 737.

## 2. DNA Extraction Method

Genomic overall DNA of the people that were included in the study was extracted from white blood cells with the salting-out method (1), with the previously described modifications (2), or with the QIAmp™ 96 DNA blood kits from Qiagen.

### 3. Single-Strand Conformation Polymorphisms (SSCP)

#### a) Radioactive Method

In order to prove LDL receptor gene mutations, all 18 exons of the LDL receptor gene were amplified with the help of the oligonucleotides published by Hobbs et al (3).

In order to duplicate exon 18c of the SREBP-1 gene including the exon/intron border so as to discover splicing mutations as well, the following pair of oligonucleotides was used: S1.18cF (seq. id. no. 9): 5'-TTATTTATAATCTGGGTTTTGTGTC-3' and S1.18cR (seq. id. no. 10): 5'-GGGAAGAGCTAAGTTAAAAGTTGTG-3'. In order to amplify exon 10 of the SREBP-2 gene including its exon/intron borders, the oligonucleotides *EcoRI* S2.10 F (seq. id. no. 15): 5'-CGGAATTCGCCAGTGACCATTAACACCTTTTGA-3' and *EcoRI* S2.10 R (seq. id. no. 16): 5'-CGGAATTCTGCAGCAAGCCAGTCATCAGCAGCT-3' were used. The PCR was conducted in a final volume of 6 µl in 2x PCR buffer (Perkin Elmer) by employing 1.0 U *Taq* polymerase (Qiagen), 74 kBq [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (Amersham) with a final concentration of 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 420 µM of each of the four dNTP (Qiagen), and 8.3 µM of each of the two oligonucleotides.

For SSCP of the LDL receptor gene, genomic DNA (200 ng) was amplified under the following PCR conditions: 95°C, 180 sec. (1 cycle); 95°C, 45 sec.; 58°C, 30 sec.; 72°C, 120 sec. (29 cycles). For SSCP of the SREBP-1 and SREBP-2 genes 200 ng genomic DNA was PCR-amplified as follows: 95°C, 180 sec. (1 cycle); 95°C, 60 sec.; 58°C, 30 sec.; 72°C, 60 sec. (30 cycles). After the PCR, 25 µl denaturation buffer (95% formamide, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xlenecyanole, 20 mM EDTA) was added to the PCR mixture. After 5 minutes of denaturation at 95°C, 6 µl of the mixture was placed on a 7%

polyacrylamide gel (acrylamide:bisacrylamide mixture 37.5:1), 2x TBE, 1.37 M glycerol, gel thickness 0.75 mm), and the gel was permitted to remain in 1x TBE buffer at 4°C in a cooling chamber or at room temperature at 15-20 V/cm for 12-16 hours. Afterwards, the gel was dried with a vacuum dryer at 80°C for one hour and Kodak X-OMAT AR films were exposed at room temperature for 3-36 hours.

#### **b) Non-Radioactive Method**

For the non-radioactive identification of sequence variations in exon 10 of the SREBP-2 gene including its exon/intron borders, the oligonucleotides *Eco*R I S2.10F and *Eco* R I S2.10 R were used. The PCR was performed in a final volume of 11 µl in 1x PCR buffer (Qiagen) by employing 1.0 U *Taq* polymerase (Qiagen) and final concentrations of 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 909 µM of each of the four dNTP (Qiagen) and 4.6 µM of each of the two oligonucleotides. Genomic DNA (100 ng) was amplified under the following conditions: 95°C, 180 sec. (1 cycle); 95°C, 60 sec.; 58°C, 30 sec.; 72°C, 60 sec. (29 cycles). After the PCR, 25 µl denaturation or loading buffer (97% formamide, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xlenecyanole, 10 mM NaOH) was added to the PCR mixture. After 5 minutes of denaturation at 92°C and immediate chilling on ice for 10 minutes, 6 µl of the mixture was placed on Elchrom GMA Wide Mini S-50 gels and permitted to remain with 1x TAE buffer (buffer temperature 9°C) at 6 V/cm in an Elchrom Sea 2000 electrophoresis chamber for 14 hours. Upon removal of the supporting polymer, the gel was colored for 40 minutes in 50 ml SYBR® Gold (working solution based on description by manufacturer—Molecular Probes) in 0.75 x standard TAE buffer (4) on a shaker. After a 40-minute discoloration

process in 100 ml distilled water on a shaker, the gel was analyzed with 302 nm UV transillumination and digitized by employing a Gel Doc 1000 System from BioRad.

#### **4. Sequencing of LDL Receptor Gene Mutations and SREBP-1, Exon 18c, and SREBP-2, Exon 10, Mutations**

The discovered sequence variations were further analyzed by subcloning amplified exons and subsequent sequencing of the insert. On the LDL receptor gene, the PCR amplifications process of the corresponding exons was conducted with the above-described oligonucleotides (3). In the SREBP-1 gene, the PCR amplification process of the exon 18c was conducted with oligonucleotides that had additional *Eco* R I interfaces; *Eco*R I.S1.18cF (seq. id. no. 11): 5'-CGGAATTCTGAAATTATTTAATCTGGGTTTT-GTGTC-3' and *Eco*R I.S1.18cR (seq. id. no. 12): 5'-CGGAATTCATCGGGGAAGAGCT-AAGCTAAAAGTTGTG-3'. In the SREBP-2 gene, the PCR amplification of the exon 10 was conducted with *Eco*R I S2.10F: and *Eco*R I S2.10R.

The amplification reactions were conducted in a final volume of 50 µl with 1x PCR buffer (Qiagen) by employing 2.5 U *Taq* polymerase (Qiagen) and final concentrations of 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 µM of each of the dNTP (Qiagen) and 2.0 µM of each of the two oligonucleotides. The following temperatures were achieved by the Robocycler: 95°C, 45 sec.; 58°C, 30 sec.; 72°C, 45 sec. (30 cycles). The amplified fragments (50 µl) were placed on a 1% agarose gel, which contained 0.6 µl/ml ethidium bromide, cut out and cleaned with the QIAquick™ extraction kit (Qiagen). The DNA fragment was digested with 20 U *Eco*R I for at least 3 hours and cleaned with the help of the QIAquick™ PCR purification kit. The vector pcDNA 3.1 His A (3-5 µg) was digested with 40 U *Eco*R I for

three hours. Afterwards, 20 U calf intestinal peptide (Roche Diagnostics) was added and incubated for 1 hour at 37°C. The vector was cleaned with the QIAquick™ PCR purification kit and eluted with 50 µl water. The ligation was performed with the ligation kit from Takara. The cleaned PCR product (4 µl) and the cleaned pcDNA3.1 His A vector (1 µl) were ligated in accordance with manufacturer recommendations and transformed into *E. Coli* DH5α bacteria (Life Technologies) through the heat shock method (42°C for 45 sec.). Five to seven colonies were selected from persons with the wild type, based on the SSCP results, and from persons with the sequence variations and resuspended in 10 µl water. The process of genotyping for the purpose of establishing the existence of the sequence variation was performed with 2 µl of the bacteria suspension and SSCP methods, as described above. Independent clones of each of the two states (wild type/mutation) from two independent PCRs were sequenced. The DNA sequencing was performed by Microsynth AG with the dideoxy chain termination method. In order to expand the clones, 5 µl of the remaining suspension was added to 3 ml LB medium, which contained 100 µg/ml ampicillin, and incubated overnight at 37°C. From 1.5 ml of the bacteria suspension, the plasmid DNA was cleaned by employing the QIAprep™ Spin Miniprep kit (Qiagen).

#### **5. Testing for Apolipoprotein E Mutations that Influence the Plasma Cholesterol Concentration**

The two frequent apolipoprotein E amino acid polymorphisms C112R and R158C were identified through PCR amplification and subsequent digestion with *Hha* I and/or the isoschizomer *Cfo* I based on the protocol by Hixson and Vernier (5).

## **6. Testing for Apolipoprotein B Mutations that Influence the Plasma Cholesterol Concentration**

Three different molecular-biological methods were employed in order to search for mutations that lead to an amino acid exchange on position 3'500 of the apolipoprotein B gene. The samples from individuals of the SPREAD study (2) with overall cholesterol concentrations  $\leq 4.5$  mmol/L were pooled (25 samples) and tested for mutations with the methods from Ruzicka et al., 1992 (6) and from Schuster et al. (7). Individuals with overall cholesterol concentrations  $> 4.5$  mmol/L and positive pools from the SPREAD study as well as all other samples that had been examined until 1996 were tested individually with allele-specific, asymmetrical PCR, as described above (2). After 1996 this method was replaced by a site-directed mutagenesis PCR technique, which introduces an *Msp* I restriction interface in wild type samples. The subsequent digestion with *Msp* I (8) enabled the identification of patients with the R3'500Q mutation.

## **7. Methods for Identifying the SREBP-1, Exon 18c, and SREBP-2, Exon 10, Polymorphisms through Restriction Enzyme Digestion**

In the SREBP-1 gene the entire exon 18c was amplified through the primary pairs S1.18cF and S1.18cR; exon 18c contains the polymorphism that generates a variable *Xmn* I interface. In the SREBP-2 gene only the 5' portion of the exon 10 was amplified, which contains the polymorphism that generates a variable *Msp* I restriction interface. This prevented additional *Msp* I interfaces from being amplified, and a complete restriction pattern was avoided. On the SREBP-2 gene, the following oligonucleotides were used:



S2.10P.F (seq. id. no. 13): 5'-GCCAGTGACCATTAACACCTTTTGA-3' and S2.10P.R. (seq. id. no. 14): 5'-TCGTCTTCAAAGCCTGCCTCAGTGGCTGGC-3'.

For the display of the SREBP-1 polymorphism, 80 ng genomic DNA from the examined individuals was amplified under the following PCR conditions: 95°C, 240 sec. (1 cycle); 95°C, 60 sec.; 55°C, 60 sec.; 72°C, 90 sec. (33 cycles). In an overall volume of 25 µl, 2.0 µM of each of the two oligonucleotides, 400 µM of each of the dNTP (Qiagen), 1x PCR buffer (1.5 mM MgCl<sub>2</sub> final concentration, Perkin Elmer) and 0.6 U *Taq* polymerase (Qiagen) were mixed. From the non-cleaned amplicon, 20 µl was digested in 1x NE buffer with 16-32 U *Xmn* I (New England Laboratories), 0.2 µl 10 mg/ml BSA and an incubation temperature of 37°C for 5 hours.

For the display of the SREBP-2 polymorphism, about 100 ng genomic DNA was amplified through PCR under the following conditions: 95°C, 30 sec.; 58°C, 30 sec.; 72°C, 90 sec. (30 cycles). In an overall volume of 25 µl, 1.37 µM of each of the two oligonucleotides, 390 µM of each of the dNTP (Qiagen), 1x PCR buffer (1.5 mM MgCl<sub>2</sub> final concentration, Perkin Elmer) and 0.75 U *Taq* polymerase (Qiagen) were mixed. From the resulting amplicon, 20 µl was digested in 1x NE buffer with 16 U *Msp* I and an incubation temperature of 37°C for 5 hours. For the purpose of identifying the two polymorphisms, 6-8 µl of the digested reaction mixtures was placed on 10% polyacrylamide Ready gels (BioRad) and permitted to remain at room temperature on 18-22 V/cm for 25-35 minutes with 1x TBE buffer. The gels were then colored in a 50 ml 0.5 µg/ml ethidium bromide solution for 5 minutes and digitized with a Gel Doc 1000 System from BioRad at a wavelength of 302 nm UV light.

## **8. Examination for LDL Receptor Mutations as Cause of Elevated Plasma Cholesterol Concentrations**

In a sub-group of 48 individuals, the clinical diagnosis of familial hypercholesterolaemia due to an LDL receptor defect was confirmed through cosegregation studies by employing 10 different RFLP in the LDL receptor gene (9, 10). In 110 of a total of 446 families all exons of the LDL receptor gene were examined through SSCP (radioactive method) and the published oligonucleotides (3). In 22 families, the existence of LDL receptor mutations was confirmed by subcloning and sequencing exons that exhibited sequence variations.

## **9. Statistical Analysis: Population Genetics**

Data from the Geneva Survey, a study among school children (13), and data from the Swiss MONICA Study (3,341 individuals were included (14)) were used in order to generate age and sex-specific 90<sup>th</sup> percentiles for overall cholesterol and triglycerides in Switzerland. All calculations were conducted on Macintosh G3 computers using the FileMaker<sup>®</sup> CARDIOFILE database and the StatView<sup>®</sup> and SuperANOVA<sup>®</sup> programs.

Individuals with plasma cholesterol concentrations below the 90<sup>th</sup> percentile were considered normocholesterolaemic (NC), individuals with overall cholesterol concentrations above the 90<sup>th</sup> percentile hypercholesterolaemic (HC). In both groups the influence of the existence of the Apo E mutations C112R, R158C and the new amino acid polymorphisms in the SREBP-2 gene (A595G) and in the SREBP-1 gene (G1028G) was determined through multivariate test procedures.

## **10. Evaluation of Results Obtained from Above Information**

### **10.1 Association Between Polymorphisms in the SREBP-1 and -2 Genes with Plasma Cholesterol Concentrations**

#### **10.1.1 Proof of Mutations in the SREBP-1 and -2 Genes with PIC Values Above 0.25**

A collective of individuals was examined for the existence of sequence variations through the single-strand conformation polymorphism method (SSCP). The goal consisted of detecting polymorphisms whose occurrence reaches a frequency at which population-genetic examinations can be conducted. For this purpose, a polymorphism information content (PIC) value of above 0.25 was established. The two sequence variations that were detected with the single-strand conformation polymorphism method—one in the exon 18c of the SREBP-1 gene and the other in the exon 10 of the SREBP-2 gene—meet this condition and were therefore further characterized. Exon 18c of the SREBP-1 gene and exon 10 of the SREBP-2 gene from individuals that exhibited the corresponding SSCP patterns deviating from the wild type were amplified. These exon sequences were subcloned and sequenced.

Figure 1A shows the chromatogram of an individual that is a carrier of a DNA polymorphism in amino acid position 1028 in the exon 18c of the SREBP-1 gene (G1028G). Figure 1B shows the chromatogram of an individual where a DNA polymorphism that leads to an amino acid exchange on position 595 in the SREBP-2 gene (A595G) was detected.

In the SREBP-1 gene a C → G base substitution in the exon 18c was detected. This base substitution does not lead to an amino acid exchange; however, it generates an *Xmn* I restriction interface (Figure 1A). In the SREBP-2 gene a C → G base substitution was detected. This base substitution leads to an exchange of alanine to glycine in the amino acid sequence and generates an additional restriction interface *Msp* I (Figure 1).

The corresponding PIC values, which were calculated from all individuals that were included with the exception of related individuals that were part of the SIBSHIP study (N=2,446), were 0.368 for the SREBP-1 gene polymorphism and 0.300 for the SREBP-2 gene polymorphism. In order to be able to screen larger collectives with regard to these polymorphisms, a method was developed for each of the two polymorphisms based on a PCR amplification of the corresponding DNA section and subsequent restriction enzyme digestion (Figure 2). Neither the G1028G polymorphism nor the A595G polymorphism deviated significantly from the Hardy-Weinberg equilibrium ( $P > 0.70$  and  $P > 0.10$ , when basing the calculation on a recessive effect). In HeLa cells the G1028G polymorphism was detected on only one of the two alleles (heterozygote with regard to the G1028G polymorphism (12)). The A595G mutation could not be detected in HeLa cells (homozygote with regard to the A595A polymorphism).

### 10.1.2 Population Genetics

A total of 3,078 individuals was examined; 2,600 individuals, where overall cholesterol values were measured without treatment, were tested with regard to mutations and polymorphisms in four genes. One sub-group of 954 individuals was composed of random

samples from cross-sectional examinations (SPREAD, IDA); 318 were unrelated individuals from the SIBSHIP study (one unaffected person per family and all spouses, brothers-in-law, and sisters-in-law that were not genetically related (REL)). A total of 871 people was included from patient collectives with primary and secondary hyperlipoproteinaemia. All 3,078 individuals of the patient and control collectives were tested for the existence of mutation in the Apo B-100 gene leading to an amino acid exchange in position 3'500 in order to identify patients with FDB in the control collectives and the patient collectives with familial hyperlipoproteinaemia. In order to identify patients with familial dysbetalipoproteinaemia, all 3,078 individuals were examined for the existence of a mutation in the Apo E gene at amino acid position 158 (E2 allele) as well as for the existence of the mutation at position 112 (E4 allele). The existence of LDL receptor gene defects generally leads to a significant—double or triple—increase in overall cholesterol concentrations, so that only patients with primary forms of hyperlipoproteinaemia and clearly elevated overall cholesterol concentrations were examined for the existence of these mutations. Table 1 shows an overview of the various patient and control collectives. Individuals from the control groups for whom proof existed that they suffered from certain problems leading to primary or secondary forms of hyperlipoproteinaemia were also included in the patient collective with the corresponding problem. Therefore, the sum of all persons of all sub-groups is larger than the number of individuals altogether (N=2,600). Table 1 stratifies the patient and control collectives by individuals with overall cholesterol concentrations below the 90<sup>th</sup> percentile (normocholesterolaemic, NC) and individuals with overall cholesterol concentrations above the 90<sup>th</sup> percentile (hypercholesterolaemic, HC).

The patient and control collectives listed in table 1 were tested for the existence of the described polymorphism with the help of the above-mentioned methods (screening of person collectives with higher throughput).

Three additional genes were examined: the Apo E gene (amino acid polymorphisms C112R and R158C), the Apo B-100 gene (mutation at amino acid position 3'500, R3'500Q). In the LDL receptor gene, mutations that lead to familial hypercholesterolaemia were identified through SSCP, subsequent amplification of the corresponding exons in which sequence variations were detected, subcloning, and sequencing.

A total of 3,078 individuals was tested for the existence of amino acid substitution in the Apo B gene (R3'500Q) as well as for the existence of two amino acid polymorphisms in the Apo E gene (C112R or E4 allele, R158C or E2 allele); all three mutations are known to modify the plasma cholesterol concentration.

Additionally, 2,600 individuals were examined with regard to a new DNA polymorphism in the SREBP-1 gene (G1028G), which was used as an indicator. All 3,078 individuals were tested with regard to a new DNA polymorphism in the SREBP-2 gene (A595G), which leads to an amino acid exchange.

In these individuals the overall plasma cholesterol concentrations were measured. Of the 3,078 persons that were included, 478 were taking lipid-lowering medications upon entering the study; because overall cholesterol concentrations without treatment were not available, these individuals were excluded from further examinations. From the remaining 2,600 persons, as described above, overall plasma cholesterol concentrations without treatment, standardized for the age of 50, were included in additional analyses. Table 2 summarizes the results of the prevalence of the two polymorphisms in the corresponding

sub-groups of the patient and control collectives as well as the average overall cholesterol concentrations of the various sub-groups in relation to the existence of the polymorphism.

Overall a highly significant, cholesterol-lowering effect of the A595G mutation in the SREBP-2 gene was detected (Table 2,  $N=2,600$ ;  $P=0.0005$ ). This effect was even more distinct when the homozygote carriers of the C112R mutation in the Apo E gene (E3/E4) ( $N=107$ ) were excluded from the examination ( $N=2,493$ ;  $P<0.0001$ ). When including only genetically unrelated individuals in the examination, i.e., excluding related individuals from the SIBSHIP study, the probability that the difference was based on coincidence decreased even more ( $N=2,446$ ;  $P=0.0003$ ). Figure 3 shows the analysis of the collective of unrelated individuals ( $N=2,446$ ), which was composed of all individuals with the exception of the genetically related persons from the SIBSHIP study, after stratification with regard to various criteria. Figure 3A and B display the effect of the G1028G and A595G polymorphisms in randomly selected individuals. Random samples (established as such) with regard to hypercholesterolaemia included the SPREAD and IDA studies as well as the collective of unrelated, unaffected individuals (REL) and persons who were selected due to the possible impairment of their memory function (MCS). Due to the existence of hypercholesterolaemia, the remaining collectives were selected (not randomly). Through variance analyses (ANOVA, Scheffé test), a significant effect could be proven for the G1028G polymorphism when the collective was stratified with regard to the selected group (randomly/not randomly) ( $P=0.0164$ ). Similarly, the effect with regard to the A595G mutation could be shown in both groups; ANOVA resulted in a probability of  $P<0.0001$  that the difference was based on coincidence. Figures 3C and D show the stratification with

regard to the 90<sup>th</sup> percentile (NC, HC). The G1028G polymorphism resulted in a significant effect when applying ANOVA ( $P=0.0088$ ). For the A595G mutation, the analysis also showed a probability of  $P<0.0001$  when taking the additional factor into consideration.

Furthermore, the known cholesterol-modifying effect of the Apo E gene polymorphisms C112R ( $\epsilon 4$ ) and R158C ( $\epsilon 2$ ) could be shown in the tested examination collective ( $N=2,600$ ;  $P<0.0001$ ).

Figures 3E and F display the gene-gene interactions between Apo E and the SREBP-1 and -2 genes. When all 2,600 individuals were included in the examination, no significant, cholesterol-modifying effect of the G1028G polymorphism in the SREBP-1 gene could be detected. When including the effects of the Apo E gene in the analysis, the difference between the homozygote form of the polymorphisms (22) and the other two alleles (11/12) was not significant for the G1028G polymorphism (ANOVA,  $P=0.0722$ ). However, when homozygote or heterozygote carriers of the Apo E C112R ( $\epsilon 4$ ) mutation were excluded ( $N=761$ ), the effect of the lacking wild type allele on the overall plasma cholesterol concentrations was highly significant ( $N=1,839$ ;  $P<0.0001$ ). For the A595G polymorphism, the difference between the homozygote form of the wild type (11) and the other two alleles (12/22) was already highly significant ( $P=0.0002$ ) when including the effects of the Apo E genes in the analysis. When homozygote or heterozygote carriers of the Apo E C112R ( $\epsilon 4$ ) mutation were excluded, the probability of an effect that was based on coincidence decreased further ( $P<0.0001$ ).

Further stratification of the collectives with regard to the underlying problems that cause either primary or secondary hypercholesterolaemia is shown in Table 2. The results of the frequency calculations of the two polymorphisms (G1028G, A595G) corresponding to the



various sub-groups can be found in the first line. The results of the average overall cholesterol values without treatment in the various sub-groups, stratified with regard to the existence or lack of the G1028G and A595G polymorphisms, are shown in the second line (Table 2). In the sub-groups with primary hyperlipidaemia, the effect of the A595G mutation exhibited statistical relevance in the patient group with FDL ( $P=0.0020$ ) and in the patient group with primary hypercholesterolaemia (PHC). In these patients, mutations in the Apo E, Apo B, and LDL receptor genes had been excluded, although an autosomal-dominant or -recessive hereditary genetic defect was suspected to have been the cause of hypercholesterolaemia. In the latter collective, the prevalence of the wild type (1) allele was significantly higher (9.38%) than in the sum of the other collectives (6.69%) ( $P=0.0328$ ).

With regard to the collectives with secondary hyperlipoproteinaemia (this includes individuals classified both as NC and HC), a significant difference could be detected among males with diabetes mellitus and normal plasma triglyceride concentrations ( $TG < 2.3$  mmol/L) between A595A (11) and A595G (12/22) positive individuals ( $P=0.0018$ ). In 11.6% of individuals with secondary hyperlipoproteinaemia, plasma triglyceride concentrations were elevated.

In the SREBP-1 gene, the prevalence of the wild type allele was 40.35% in the homozygote state (11); the prevalence of the G1028G polymorphism was 45.62% in the heterozygote state (12) and 14.04% in the homozygote state (22) ( $N=2,600$ ). In the SREBP-2 gene, the prevalence of the wild type was 6.69% in the homozygote state (11); the prevalence of the A595G mutation was 35.15% in the heterozygote state (12) and 58.15% in the homozygote state (22) ( $N=2,600$ ).

In order to explain the effect of the detected DNA and amino acid polymorphism on the overall plasma cholesterol concentrations, 3,078 individuals were examined from a

molecular genetic point of view. For 2,600 individuals, both demographic and clinical data could be provided, including information about age, sex, overall cholesterol concentrations without treatment with lipid-lowering medication at the time the cholesterol was read, genotype with regard to the Apo E amino acid polymorphism (C112R or  $\epsilon$ 4 allele, R158C or  $\epsilon$ 2 allele), and on the Apo B100 mutation, which was initially detected to be the cause of FDB (R3'500Q). The R158C amino acid polymorphism exhibits a cholesterol-modifying effect in the homozygote state in the population that was examined ( $P < 0.0001$ ). Among people that were carriers of the R3'500Q mutation (FDB), overall cholesterol concentrations were elevated in comparison to people without Apo B defect ( $P < 0.0001$ ). Among people with proven LDL receptor mutations (FHM), the average overall cholesterol concentrations were elevated compared to the control groups ( $P < 0.0001$ ). In general, the DNA polymorphism (G1028G) detected in the SREBP-1 gene does not significantly influence the overall plasma cholesterol concentrations in this group of individuals. In combination with the existence of the Apo B R3'500Q mutation, the G1028G (22) polymorphism, however, was associated with an increase in plasma cholesterol concentrations ( $P = 0.0097$ ). Further stratification of the individuals participating in the study in accordance with the underlying genetic problems or the clinical diagnosis confirmed the effect of the new SREBP-2 amino acid polymorphism on overall plasma cholesterol concentrations in almost all groups; however, none of the differences were statistically significant except for the patient group with familial dysbetalipoproteinaemia, FDL, and among people who suffer from hypercholesterolaemia due to unknown genetic defects (PHC).

## 10.2 Association of the A595G Mutation with Senile Dementia of the Alzheimer

### Type

Another remarkable result of the present study is the significant difference between the prevalence of the wild type allele (A595A) and amino acid substitution (A595) when comparing a clinically diagnosed Alzheimer patient collective with the prevalence in the general population (Table 2, 2.4% versus 7.0%;  $P=0.0234$ ).

### **10.3 Association of the G1028G Polymorphism with a Lack in the Increase of Plasma Lipid Concentration upon the Administration of Protease Inhibitors among HIV Patients**

The results regarding the prevalence differences are also shown in Table 2 ( $P=0.0339$ ). Figure 4 depicts the percentage change of the plasma cholesterol level before and after the administration of protease inhibitors in dependency upon the G1028G polymorphism.

## **11. Study Comprising the Polymorphism in Exon 6 of SREBP-2**

### **11.1 Fundamental Principles**

#### Probands

A total of 1,081 probands from the same groups as described above (711 from the SPREAD study, 346 from the IDA study, and 24 from a prospectively examined collective of deceased people in Basel (PATH Study)) was included in this examination.

#### Materials

Apart from the materials described above, the restriction enzyme *Dde* I (New England Biolabs) was also used.

### Methods

The probands that were included in the study were additionally tested for further mutation in the SREBP-2 gene (exon 6), which leads to an amino acid exchange (R371K).

The SREBP-2 R371K mutation was basically examined as already described above. In particular, the above-mentioned non-radioactive method was employed for the lipoprotein analyses, the DNS extraction method, and the determination of the single-strand conformation polymorphism (SSCP).

### **11.2 Sequencing of the SREBP-2, Exon 6 Mutation**

It was performed as already described above, with the following modifications: In the SREBP-2 gene, the PCR amplification of the exon 6 was performed through the oligonucleotides *EcoR* I.S2.6F (seq. id. no. 17): 5'-CGGAATTCTGGTCTCACTGTG-TTTTCACTCATC-3' and *EcoR* I.S2.6R (seq. id. no. 18): 5'-CGGAATTCGCCAGGG-CTGACAAGCCTTTTCTCA-3'. The amplification reaction was performed in a final volume of 50 µl in 1x PCR buffer (Qiagen) by employing 0.4 U *Taq* polymerase (Qiagen) and final concentrations of 3.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 455 µM of each of the dNTP (Qiagen) and 2.0 µM of each of the two oligonucleotides at the following temperatures: 94°C (45''); 56°C (30''); 72°C (1'); 32 cycles. The amplified fragments were analyzed through subcloning and subsequent sequencing of the inserts (as already described).

### **11.3 Methods for Identifying the SREBP-2, Exon 6 Mutation through Restriction Enzyme Digestion**

In order to show the SREBP-2 mutation (exon 6, R371K), about 100 ng genomic DNS was amplified with the above-described methods by employing the oligonucleotides *EcoR*

I.S2.6F and *EcoR* I.S2.6R. 20 µl was digested in 1x NE buffer with 7 U *Dde* I and an incubation temperature of 37°C for 5 hours. Four µl 5x non-denaturing loading buffer (Elchrom) was added to the digested reaction mixture. Seven µl of this mixture was placed on Spreadex Wide-Mini S-100 gels (Elchrom), permitted to remain on 10 V/cm for 25-45 minutes at 55°C, colored with ethidium bromide (40 minutes), discolored with distilled water (40 minutes), and digitized with a Gel Doc 1000 System.

#### 11.4 Statistical Methods

In order to compare the prevalences of sequence variations in the SREBP-1 and -2 genes, the chi-square test was applied.

#### 11.5 Evaluation of the Results obtained from the Above

The median age of the 698 probands of the SPREAD study was 20.5 years (age range 18.8 – 43.7 years); the median age of the 370 probands of the IDA study was 74.5 years (age range 47.0 – 95.4 years). A comparison of the two groups of probands, who were not selected but were of different ages, showed significant statistical differences in the existence of SREBP-1 and SREBP-2 mutations.

The prevalence of the lack of the SREBP-1c-G1028G polymorphism in the homozygote form (i.e., genotype 11/12) among probands of the SPREAD study was 622/711 (87.5%) compared to only 304/367 (82.8%) among the probands of the IDA/PATH study. This results in an absolute difference of -4.7% (or relative difference of -5.4%) at a P value of 0.038 (chi-square test).

The prevalence of the lack of the SREBP-2 A595G polymorphism in the homozygote form (i.e., genotype 11/12) among probands of the SPREAD study was 305/711 (43.0%)

compared to only 135/370 (36.5%) among the probands of the IDA/PATH study. This results in an absolute difference of -6.8% (or relative difference of -15.1%) at a P value of 0.041.

The prevalence of the SREBP-2 R371K mutation among probands of the SPREAD study was 19/698 (2.7%) compared to only 3/370 (0.8%) among the probands of the IDA/PATH study. This results in an absolute difference of -1.9% (or relative difference of -70.4%) at a P value of 0.036.

### 11.6 Discussion

The differences in the prevalences in the group of younger or older probands can only be explained with the differences in mortality since both random samples were taken from the same population.

Among the IDA/PATH study population, with a median age of 74.5 years, therefore numerous probands are now deceased. The carriers of the SREBP-2 G1'028G genotype 11/12 are: 316 carriers expected in this group based on data from the SPREAD study; however, only 304 probands with this genotype (11/12) were observed. Thus 12 probands are missing from this group.

The same applies to the carriers of the SREBP-2 A595G genotype 11/12: 159 carriers were expected in this group based on data from the SPREAD study; however only 135 probands with this genotype (11/12) were observed. Thus 24 probands are missing from this group.

This also applies to the rarer carriers of the SREBP-2 R371K mutation: 10 carriers were expected in this group based on data from the SPREAD study; however only 3 probands with this mutation were observed. Thus 7 probands are missing from this group.

An explanation for the significantly lower prevalence of certain sequence variations in SREBP-1 and SREBP-2 is the increased rate of mortality among carriers of genotypes

SREBP-1.18c (11/12), SREBP-2.10 (11/12) and carriers of the SREBP-2 R371K mutation. This may be due to the above-described association with an elevated plasma cholesterol level with the consequence of coronary heart disease, but also to the overproportional occurrence of diseases, such as senile dementia of the Alzheimer type, as has also already been described, based on the two risk factors mentioned above or in combination with additional risk factors.

Table 1

| Table 1   |                                    |  |            |           |                 |                |   |                |   |                        |
|---|------------------------------------|--|------------|-----------|-----------------|----------------|---|----------------|---|------------------------|
| Collective  | Studies                            | Description of Collective                            | Age        | Sex       | All Individuals |                | Normocholesterolaemic Individuals <sup>1)</sup> |                | Hypercholesterolaemic Individuals <sup>1)</sup> |                        |
|   |                                    |  | Mean Value | m / (m+w) | A               | TC<br>(± 1 SD) | A   | TC<br>(± 1 SD) | A   | TC<br>(± 1 SD)         |
| All Individuals   |                                    |  |            |           |                 |                |   |                |   |                        |
| TTL   | SPREAD, SIBSHIP, IDA, MCS, STARTER | All Age Groups                                       | 45.55      | 0.66      | 2,600           | 6.84 ± 2.52    | 1,980   | 5.80 ± 1.32    | 620   | 10.14 ± 2.58           |
| Collectives of Randomly Selected Individuals                                      |                                    |  |            |           |                 |                |   |                |   |                        |
| RDM,  | SPREAD                             | Random Samples (young)                               | 20.77      | 1.00      | 630             | 5.12 ± 0.88    | 612   | 5.05 ± 0.78    | 18  | 7.40 ± 1.17            |
| YNG   |                                    |  |            |           |                 |                |   |                |   |                        |
| RDM,  | IDA                                | Random Samples (older)                               | 75.98      | 0.67      | 324             | 6.46 ± 1.49    | 316   | 6.39 ± 1.45    | 8   | 8.93 ± 1.01            |
| ELD   |                                    |  |            |           |                 |                |   |                |   |                        |
| Collectives of Individuals with Problems that Cause Primary Hyperlipoproteinaemia |                                    |  |            |           |                 |                |   |                |   |                        |
| FDL   | SPREAD, SIBSHIP, IDA, MCS, STARTER | Apolipoprotein E Defect (R158C, homozygote)          | 46.17      | 0.76      | 46              | 9.90 ± 4.10    | 15  | 5.27 ± 1.43    | 31  | 12.15 ± 2.89<br>-> FDL |
| FDB   | SPREAD, SIBSHIP, IDA, MCS, STARTER | Apolipoprotein B Defect (R3'500Q, heterozygote)      | 41.49      | 0.54      | 37              | 9.046 ± 1.341  | 5   | 6.93 ± 0.86    | 32  | 9.38 ± 1.08<br>-> FDB  |
| FHM   | SIBSHIP                            | LDLR Defect (molecular genetically proven)           | 34.87      | 0.51      | 74              | 10.93 ± 2.43   |   |                | 74  | 10.93 ± 2.43<br>-> FH  |
| PHC   | SIBSHIP                            | Primary Isolated Hypercholesterolaemia <sup>2)</sup> | 40.58      | 0.55      | 341             | 9.90 ± 2.62    | -   | -              | 341   | 9.90 ± 2.62            |
| PCH   | SIBSHIP                            | Primary Combined Hyperlipoproteinaemia <sup>2)</sup> | 47.48      | 0.82      | 85              | 9.98 ± 2.22    | -   | -              | 85  | 9.98 ± 2.22<br>-> FCH  |
| REL   | SIBSHIP                            | Relatives, unaffected <sup>3)</sup>                  | 40.19      | 0.54      | 318             | 6.39 ± 1.19    | 310   | 6.35 ± 1.17    | 8   | 8.11 ± 0.34            |

Replacement Page (Rule 26)



| Collectives of Individuals with Problems that Cause Secondary Hyperlipoproteinaemia <sup>a)</sup> |                            |  |       |      |     |      |        |     |      |        |    |       |        |
|---|----------------------------|--|-------|------|-----|------|--------|-----|------|--------|----|-------|--------|
| DIA   | STARTER, SIBSHIP, IDA, MCS | Diabetes Mellitus (Glucose Plasma > 7.8 mmol/L)            | 50.96 | 0.59 | 229 | 6.48 | ± 1.97 | 191 | 5.87 | ± 1.21 | 33 | 9.55  | ± 2.20 |
| RIN   | STARTER, SIBSHIP, IDA, MCS | Kidney Insufficiency (Clarification $\sigma$ < 50 ml/min.) | 76.63 | 0.44 | 131 | 7.17 | ± 2.68 | 115 | 6.83 | ± 2.58 | 16 | 9.65  | ± 2.07 |
| LIV   | STARTER, SIBSHIP, IDA, MCS | Alcohol Consumption > 60g/d and/or $\gamma$ -GT > 664/l    | 53.32 | 0.85 | 151 | 8.22 | ± 2.89 | 86  | 6.49 | ± 1.25 | 65 | 10.52 | ± 2.84 |
| HTH   | STARTER, SIBSHIP, IDA, MCS | Thyroid Function (TSH > 4.0 mIU/L)                         | 59.53 | 0.15 | 102 | 6.54 | ± 1.97 | 86  | 5.92 | ± 1.02 | 16 | 9.86  | ± 2.49 |
| Collectives of Individuals with Problems that May be Associated with SREBP-1 and/or -2            |                            |  |       |      |     |      |        |     |      |        |    |       |        |
| MEM, TTL  | MCS                        | Adults (all age groups)                                    | 70.63 | 0.46 | 413 | 6.24 | ± 1.67 | 387 | 6.09 | ± 1.61 | 26 | 8.39  | ± 0.93 |
| MEM, DAT  |                            | Dementia of Alzheimer Type (MMS < 26)                      | 73.50 | 41.2 | 165 | 6.16 | ± 1.31 | 157 | 6.06 | ± 1.25 | 8  | 8.17  | ± 0.61 |
| HIV.STB   | STARTER                    | TC, not increasing with protease inhibitors <sup>b)</sup>  | 34.24 | 80.0 | 25  | 4.79 | ± 1.31 | 24  | 4.70 | ± 1.25 | 1  | 7.05  |        |
| HIV.INC   |                            | TC, increasing with protease inhibitors <sup>b)</sup>      | 38.06 | 84.0 | 20  | 4.52 | ± 0.91 | 20  | 4.52 | ± 0.91 |    |       |        |

## Replacement Page (Rule 26)

- 1) Normocholesterolaemic: plasma cholesterol < 90<sup>th</sup> percentile, corresponding to age and sex; hypercholesterolaemic: plasma cholesterol > 90<sup>th</sup> percentile, corresponding to age and sex
- 2) Underlying molecular defects unknown
- 3) Only unrelated individuals (one unaffected person per family and all spouses, brothers-in-law, and sisters-in-law genetically unrelated)
- 4) Combined collectives of individuals who were selected based on secondary hyperlipoproteinaemia and individuals from other collectives
- 5) HIV positive individuals where the overall plasma cholesterol concentrations do not (STB) increase or increase upon administration of protease inhibitors (INC)

Table 2

| Table 2         | SREBP-1 Polymorphism (G1028G) |       |         |       |         |                             |       |  |  |  | SREBP-2 Polymorphism A595G |  |  |  |  |                  |  |  |  |  |                  |  |  |  |  |                   |  |  |  |  |   |  |  |  |  |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|-----------------|-------------------------------|-------|---------|-------|---------|-----------------------------|-------|--|--|--|----------------------------|--|--|--|--|------------------|--|--|--|--|------------------|--|--|--|--|-------------------|--|--|--|--|---|--|--|--|--|---|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
|                 | 11                            |       |         |       |         | 12                          |       |  |  |  | 22                         |  |  |  |  | 11               |  |  |  |  | 12               |  |  |  |  | 22                |  |  |  |  | P |  |  |  |  | P |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                 | Prevalence <sup>1)</sup>      |       |         |       |         | TC Mean Value <sup>2)</sup> |       |  |  |  | ΔTC <sup>5</sup>           |  |  |  |  | ΔPR <sup>3</sup> |  |  |  |  | ΔTC <sup>6</sup> |  |  |  |  | ΔPR <sup>4)</sup> |  |  |  |  |   |  |  |  |  |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Collective      |                               |       |         |       |         |                             |       |  |  |  |                            |  |  |  |  |                  |  |  |  |  |                  |  |  |  |  |                   |  |  |  |  |   |  |  |  |  |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| All Individuals |                               |       |         |       |         |                             |       |  |  |  |                            |  |  |  |  |                  |  |  |  |  |                  |  |  |  |  |                   |  |  |  |  |   |  |  |  |  |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| TTL             | PR                            | 40.35 | (1,049) | 45.62 | (1,186) | 14.04                       | (365) |  |  |  |                            |  |  |  |  |                  |  |  |  |  |                  |  |  |  |  |                   |  |  |  |  |   |  |  |  |  |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

Replacement Page (Rule 26)

| Collective   | SREBP-1 Polymorphism (G1028G) |       |            |       |            |               | SREBP-2 Polymorphism A595G |        |       |            |               |            |       |            |        |
|--|-------------------------------|-------|------------|-------|------------|---------------|----------------------------|--------|-------|------------|---------------|------------|-------|------------|--------|
|  | 11                            | 12    | 22         | P     | P          | $\Delta PR^3$ | 11                         | 12     | 22    | P          | P             |            |       |            |        |
| Prevalence <sup>1)</sup>   |                               |       |            |       |            |               |                            |        |       |            |               |            |       |            |        |
| TC Mean Value <sup>2)</sup>  |                               |       |            |       |            | $\Delta TC^5$ |                            |        |       |            | $\Delta TC^6$ |            |       |            |        |
| Collectives of Individuals with Problems that Cause Secondary Hyperlipoproteinaemia    |                               |       |            |       |            |               |                            |        |       |            |               |            |       |            |        |
| DIA  | PR                            | 39.30 | (90)       | 43.67 | (100)      | 17.03         | (39)                       | 0.1723 | 6.55  | (15)       | 38.86         | (89)       | 54.59 | (125)      | 0.9282 |
|  | TC                            | 6.47  | $\pm 1.78$ | 6.44  | $\pm 1.88$ | 6.62          | $\pm 2.57$                 | 0.6233 | 6.48  | $\pm 1.69$ | 6.47          | $\pm 1.92$ | 6.49  | $\pm 2.05$ | 0.9985 |
| RIN  | PR                            | 40.46 | (53)       | 45.80 | (60)       | 13.74         | (18)                       | 0.9197 | 6.11  | (8)        | 40.46         | (53)       | 53.44 | (70)       | 0.7832 |
|  | TC                            | 7.27  | $\pm 3.37$ | 7.15  | $\pm 2.01$ | 6.96          | $\pm 2.49$                 | 0.7193 | 7.44  | $\pm 2.04$ | 7.14          | $\pm 3.42$ | 7.16  | $\pm 2.07$ | 0.7692 |
| LIV  | PR                            | 38.51 | (57)       | 47.30 | (70)       | 14.19         | (21)                       | 0.9567 | 8.11  | (12)       | 32.43         | (48)       | 61.49 | (91)       | 0.5249 |
|  | TC                            | 8.14  | $\pm 2.55$ | 8.53  | $\pm 3.31$ | 7.92          | $\pm 2.11$                 | 0.6011 | 9.81  | $\pm 4.78$ | 8.02          | $\pm 3.06$ | 8.25  | $\pm 2.43$ | 0.0696 |
| HTH  | PR                            | 37.63 | (35)       | 46.24 | (43)       | 16.13         | (15)                       | 0.5545 | 6.45  | (6)        | 24.73         | (23)       | 68.82 | (64)       | 0.9246 |
|  | TC                            | 6.17  | $\pm 1.80$ | 6.55  | $\pm 1.87$ | 6.00          | $\pm 1.29$                 | 0.2678 | 7.46  | $\pm 1.56$ | 7.09          | $\pm 2.78$ | 6.00  | $\pm 1.11$ | 0.1174 |
| Collectives of Individuals with Problems that May be Associated with SREBP-1 and/or -2 |                               |       |            |       |            |               |                            |        |       |            |               |            |       |            |        |
| TTL-DAT  | PR                            | 40.16 | (978)      | 45.59 | (1,110)    | 14.25         | (347)                      | 0.2318 | 6.98  | (170)      | 34.99         | (852)      | 58.03 | (1,413)    | 0.0234 |
|  | TC                            | 6.78  | $\pm 2.53$ | 6.82  | $\pm 2.58$ | 7.05          | $\pm 2.63$                 | 0.2225 | 7.48  | $\pm 3.52$ | 6.88          | $\pm 2.63$ | 6.81  | $\pm 2.39$ | 0.0018 |
| DAT  | PR                            | 43.03 | (71)       | 46.06 | (76)       | 10.91         | (18)                       | 0.4050 | 2.42  | (4)        | 37.58         | (62)       | 60.00 | (99)       | 0.0487 |
|  | TC                            | 6.14  | $\pm 1.22$ | 6.24  | $\pm 1.28$ | 5.92          | $\pm 1.78$                 | 0.2772 | 7.44  | $\pm 1.19$ | 6.14          | $\pm 1.34$ | 6.12  | $\pm 1.28$ | 0.0487 |
| HIV-STB  | PR                            | 52.00 | (13)       | 28.00 | (7)        | 20.00         | (5)                        | 0.0339 | 16.00 | (4)        | 36.00         | (9)        | 48.00 | (12)       | 0.1855 |
|  | TC                            | 4.85  | $\pm 1.53$ | 4.27  | $\pm 0.59$ | 5.37          | $\pm 1.37$                 | 0.2772 | 3.99  | $\pm 0.62$ | 4.77          | $\pm 1.47$ | 5.08  | $\pm 1.32$ | 0.1855 |
| HIV-INC  | PR                            | 40.00 | (8)        | 60.00 | (12)       | 0.00          | (0)                        | 0.0339 | 5.00  | (1)        | 45.00         | (9)        | 50.00 | (10)       | 0.2433 |
|  | TC                            | 4.26  | $\pm 1.03$ | 4.70  | $\pm 0.82$ | -             | -                          | 0.0339 | 2.13  | -          | 4.80          | $\pm 0.26$ | 4.51  | $\pm 0.98$ | 0.0036 |

## Replacement Page (Rule 26)

1) Prevalence (PR) in percent, (number of individuals)

2) Mean value of overall plasma cholesterol concentrations (TC) in mmol/L, ( $\pm SD$ )3)  $\Delta PR = PR_{11/12}$  vs.  $PR_{22}$ ; significance level (P) of the difference between the prevalence of the collective (PR, collective) vs. prevalence of all individuals (PR, TTL) minus prevalence of the corresponding collective (PR, collective): (P of PR, collective vs. (PR, TTL - PR, collective))4)  $\Delta PR = PR_{11}$  vs.  $PR_{12/22}$ ; significance level (P) of the difference between the prevalence of the collective (PR, collective) vs. prevalence of all individuals (PR, TTL) minus prevalence of the corresponding collective (PR, collective): (P of PR, collective vs. (PR, TTL - PR, collective))5)  $\Delta TC = TC_{11/12}$  vs.  $TC_{22}$ ;  $\Delta TC = TC_{11}$  vs.  $TC_{12/22}$

**Bibliographical References:**

(Literature is cited directly in the text or reference is made to the documents listed below by indicating the appropriate reference number (in parenthesis)):

[References 1-7: text in English]

[References 8-14: text in English]

[References 15-21: text in English]

## Claims

1. Method for detecting an increased or reduced risk of disease and/or mortality and/or an increased or reduced sensitivity to therapy methods and/or their side effects, characterized by the fact that after sampling blood and/or tissue this blood and/or tissue is examined for the existence of a polymorphism in at least one sterol regulator element binding protein (SREBP), wherein the existence of a polymorphism is determined on an amino or nucleic acid level.
2. Method pursuant to claim 1, characterized by the fact that the SREBP is selected from the group comprising SREBP-1 and SREBP-2.
3. Method pursuant to claim 1 or 2, characterized by the fact that the polymorphism leads to an elevated or reduced activation of genes in lipid metabolism, particularly in cholesterol metabolism.
4. Method pursuant to claim 3, characterized by the fact that the polymorphism leads to an elevated or reduced plasma concentration of a lipid, particularly of cholesterol.
5. Method pursuant to one of the claims 1 through 4, characterized by the fact that the determination of the existence of a polymorphism takes place on a nucleic acid level.
6. Method pursuant to claim 5, characterized by the fact that the polymorphism contains a recognition sequence for an interface located within the polymorphism and that the examination takes place by employing this recognition sequence.
7. Method pursuant to claim 6, characterized by the fact that the recognition sequence is a recognition sequence for XmnI or MspI, i.e., GAANNNTTC or CCGG, wherein N can be a random nucleotide.

8. Method pursuant to claim 7, characterized by the fact that the examination occurs by employing an SREBP sequence or a partial SREBP sequence that comprises a nucleic acid sequence selected from the group of sequences listed below, possibly together with additional nucleic acids from the natural environment of the corresponding sequence:

SREBP-1, exon 18c (seq. id. no. 3):

GCACCTAGGGAAAGGCTTC

SREBP-1, exon 10 (seq. id. no. 7):

CTGCTGCCGCAACCTACA

9. Method pursuant to claim 6, characterized by the fact that the examination occurs by employing an SREBP sequence or a partial SREBP sequence that comprises the following nucleic acid sequence, possibly together with additional nucleic acids from the natural environment of this sequence:

SREBP-2, exon: CTGAAGAAG

10. Method pursuant to one of the claims 1 through 4, characterized by the fact that the determination of the existence of a polymorphism occurs on the amino acid level.

11. Method pursuant to one of the claims 1 through 9, characterized by the fact that after sampling blood and/or tissue and after DNA extraction at least a partial section of an exon of an SREBP that contains a polymorphism is amplified by employing two oligonucleotide sequences, wherein the polymorphism is characteristic of an elevated or reduced activation of genes in lipid metabolism, especially in cholesterol metabolism, and that the amplification product is subjected to a digestion process with suitable restriction enzymes or a denaturation process and that the digestion and/or denaturation products are split electrophoretically.

12. Method pursuant to claim 10 or 11, characterized by the fact that the polymorphism



is characteristic of an elevated or reduced risk of hypercholesterolaemia in humans.

13. Method pursuant to claim 11 or 12, characterized by the fact that at least one of the oligonucleotide sequences is located in the intron area that is adjacent to the exon in which the polymorphism exists.

14. Method pursuant to one of the claims 11 through 13, characterized by the fact that the oligonucleotide sequences are selected from the following pairs or sequences that can be hybridized with them under stringent conditions:

**S1.18cF** (seq. id. no. 9):

5'-TTATTATAATCTGGGTTTGTGTC-3' and

**S1.18cR** (seq. id. no. 10):

5'-GGGAAGAGCTAAGTTAAAAGTTGTG-3' or

**EcoR I.S1.18cF** (seq. id. no. 11):

5'-CGGAATTCTGAAATTATTATAATCTGGGTTTGTGTC-3' and

**EcoR I.S1.18cR** (seq. id. no. 12):

5'-CGGAATTCATCGGGGAAGAGCTAAGTTAAAAGTTGTG-3' or

**S2.10P.F** (seq. id. no. 13):

5'-GCCAGTGACCATTAACACCTTTTGA-3; and

**S2.10P.R.** (seq. id. no. 14):

5'-TCGTCTTCAAAGCCTGCCTCAGTGGCTGGC-3' or

**EcoRI S2.10F** (seq. id. no. 15):

5'-CGGAATTCGCCAGTGACCATTAACACCTTTTGA-3' and

**EcoRI S2.10R** (seq. id. no. 16):

5'-CGGAATTCTGCAGCAAGCCAGTCATCAGCAGCT-3'

**EcoRI S2.6F** (seq. id. no. 17):

5'-CGGAATTCTGGTCTCACTGTGTTTCACTCATC-3'

**EcoRI S2.6R** (seq. id. no. 18):

5'-CGGAATTCGCCAGGGCTGACAAGCCTTTTCTCA-3'.

15. Method pursuant to one of the claims 1 through 14, characterized by the fact that the polymorphism was determined by amplifying and analyzing an SREBP

sequence of interest, comparing the exon areas of this sequence of interest with the exon areas of the sequence type of the corresponding SREBP that occurs most frequently in the population and examining the sequences with detected differences for malfunction.

16. Method pursuant to claim 15, characterized by the fact that the differences lead to another amino acid and/or especially to a recognition area for a restriction enzyme.

17. Usage of the method pursuant to one of the claims 11 through 16 for the purpose of determining the increased or reduced risk of hypercholesterolaemia and/or Alzheimer's disease.

18. Usage of the method pursuant to one of the claims 1 through 16 for the purpose of determining an increased or reduced risk of the appearance of side effects during HIV therapy, especially therapy with protease inhibitors.

19. Usage of the method pursuant to one of the claims 1 through 16 for the purpose of determining an increased or reduced mortality risk.

20. DNA and/or RNA chip, characterized by the fact that it contains at least one polymorphism on an SREBP, especially SREBP-1 and/or SREBP-2.

21. DNA and/or RNA chip pursuant to claim 20, characterized by the fact that the polymorphism is a polymorphism on SREBP-1 and/or SREBP-2 as defined in one of the claims 3, 4, 6, 7, 8, and 9.

22. DNA and/or RNA chip pursuant to claim 20 or 21, characterized by the fact that it contains the SREBP polymorphism in the presence of other polymorphisms that are characteristic of the estimation of the risk of hypercholesterolaemia and/or Alzheimer's disease.

23. Usage of a polymorphism as defined in one of the claims 3, 4, 6, 7, 8, and 9 or a chip pursuant to one of the claims 20 through 22 as an indicator for determining an

elevated or reduced risk of the contraction of a disease.

24. Usage pursuant to claim 23, characterized by the fact that the disease is selected from the groups hypercholesterolaemia and Alzheimer's disease.

25. Usage of a polymorphism as defined in one of the claims 3, 4, 6, 7, 8, and 9 or a chip pursuant to one of the claims 20 through 22 for the purpose of determining an elevated or reduced risk of the occurrence of side effects during HIV therapy, especially therapy with protease inhibitors.

26. Usage of a polymorphism as defined in one of the claims 3, 4, 6, 7, 8, and 9 or a chip pursuant to one of the claims 20 through 22 for the purpose of determining an increased or reduced mortality risk.

27. Usage of a polymorphism as defined in one of the claims 3, 4, 6, 7, 8, and 9 or a chip pursuant to one of the claims 20 through 22 for the purpose of examining the suitability of a treatment method for a disease selected from the group comprising hypercholesterolaemia, Alzheimer's disease, and HIV or for the purpose of the screening of active ingredients.

28. Polymorphism that is characteristic of an increased or reduced risk of hypercholesterolaemia in humans, characterized by the fact that it occurs in a sterol regulator element binding protein (SREBP).

29. Polymorphism pursuant to claim 28, characterized by the fact that it occurs in the SREBP-1 or SREBP-2.

30. Polymorphism pursuant to claim 29, characterized by the fact that it contains a recognition sequence for XmnI or MspI, i.e., GAANNNTTC or CCGG, wherein N can be a random nucleotide.

31. Polymorphism pursuant to claim 30, characterized by the fact that it contains the following sequences:

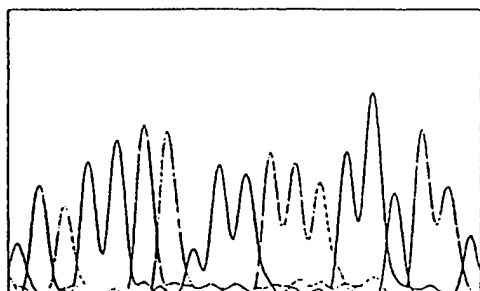
SREBP-1, exon 18c (seq. id. no. 1):

GCACCTAGGGAAAGGCTTC

SREBP-2, exon 10 (seq. id. no. 5):

CTGCTGCCGGCAACCTACA.

SREBP-1 Polymorphism



Mutated DNA

Wild Type DNA GCACCTAGG<sup>G</sup><sub>C</sub>AAAGGCTTC

Mutated DNA

GCACCTAGGGAANNNTTC  
Xmn I

Amino Acid

Sequence of

Mutated DNA

|   |   |   |   |   |   |
|---|---|---|---|---|---|
|   |   |   | ┌ |   |   |
|   |   |   | ↓ |   |   |
| H | L | G |   | K | G |
|   |   | ↑ |   |   |   |
| H | L | G |   | K | G |

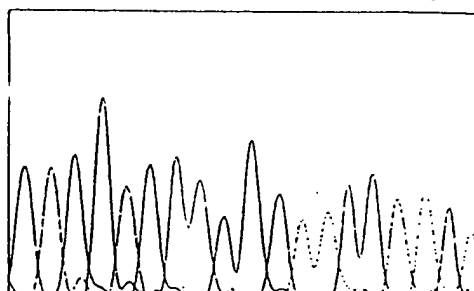
Amino Acid

Sequence of

Wild Type DNA

Figure 1A

SREBP-2 Polymorphism



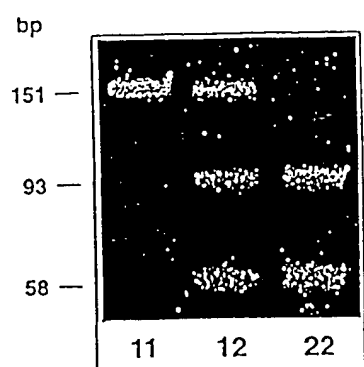
CTGCTGCCG<sup>G</sup><sub>C</sub>CAACCTACA

CTGCTGCCGGCAACCTACA  
Msp I

|   |   |   |   |   |   |
|---|---|---|---|---|---|
|   |   |   | ┌ |   |   |
|   |   |   | ↓ |   |   |
| A | A | G |   | N | L |
|   |   | ↑ |   |   |   |
| A | A | A |   | N | L |

Figure 1B

# SREBP-1 Polymorphism



Intron 19a Exon 18c

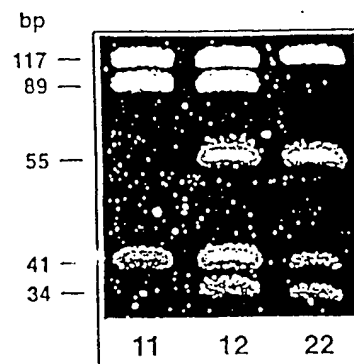
S1.18c.F S1.18c.R

1

2  
93  
Xmn I

Figur 2A

# SREBP-2 Polymorphism



Intron 9 Exon 10

S2.10P.F S2.10P.R

1 89 206

2 55 89 206  
Msp I Msp I Msp I

Figur 2B

SREBP-1 Polymorphism

SREBP-2 Polymorphism

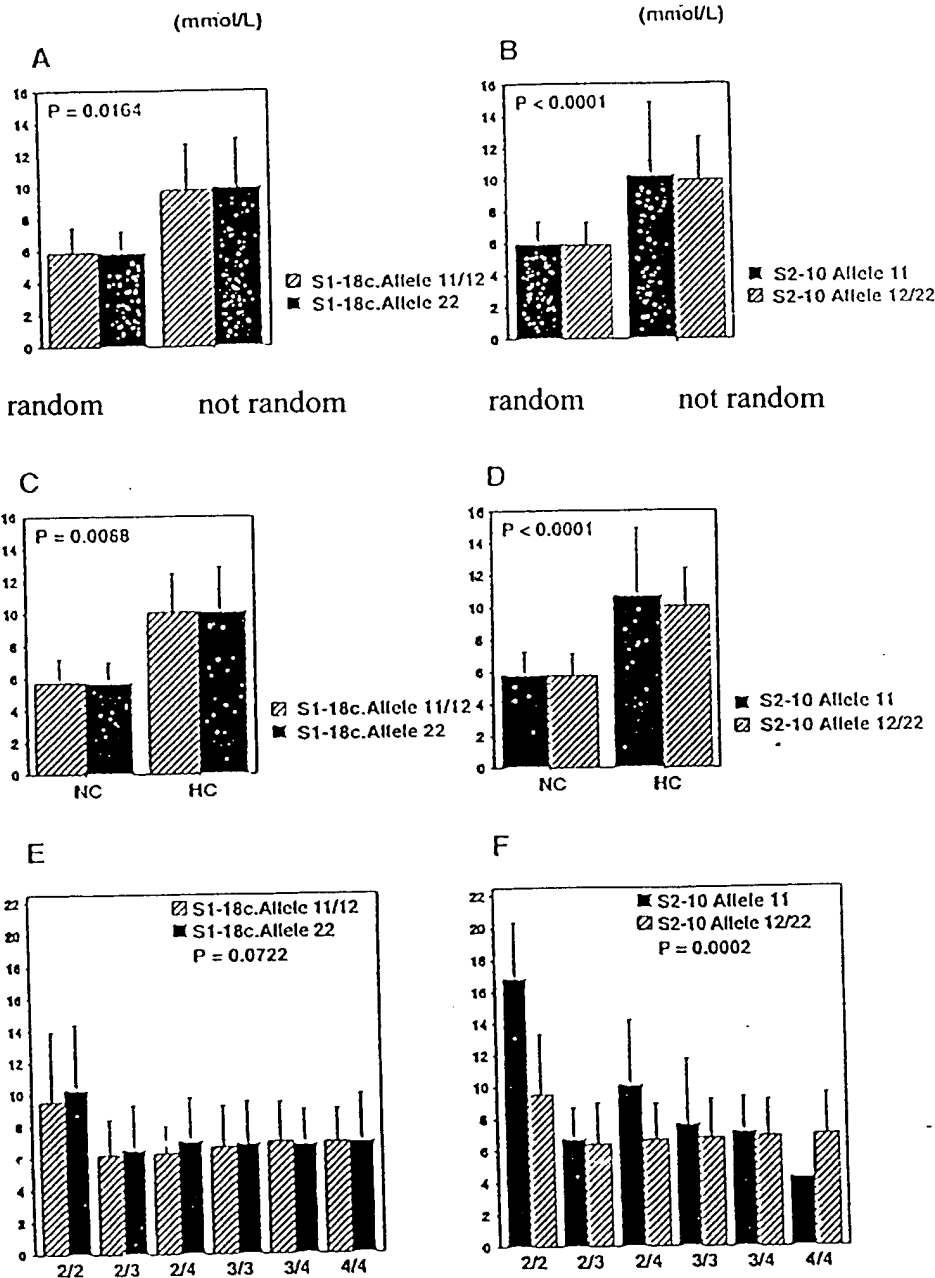


Figure 3

Change of the  
Overall Cholesterol Concentration  
after Protease Inhibitor Treatment  
(in percent)

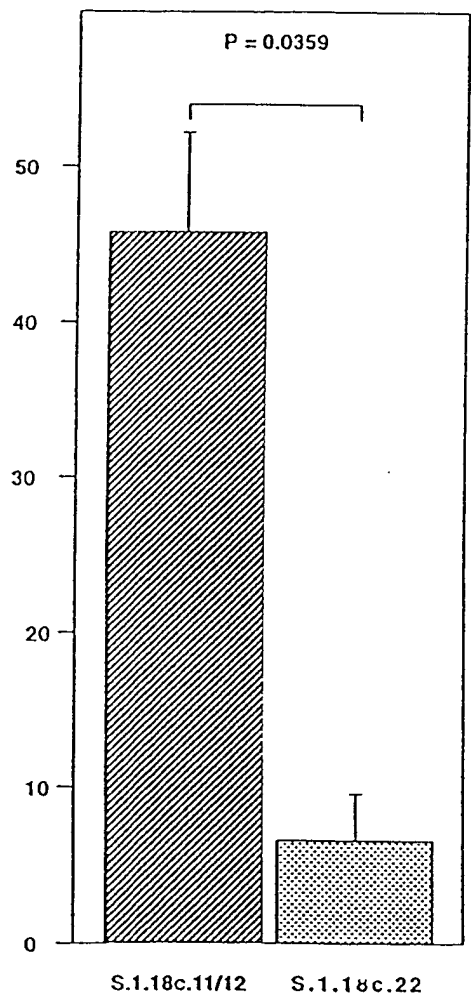


Figure 4



Sequence Log

[Translator's Note: Only text in German is included]

[Page 3]

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer

<213> Artificial Sequence

[Page 4]

<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer

<213> Artificial Sequence

[Page 5]

<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer

[Page 6]

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; Hiserez, André R.

<120> DNA-Polymorphismen in Stero-Regulator Element-Bindenden  
Proteinen

&lt;130&gt; Seq. Listing zu 02280PC

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;150&gt; Cl: 1277/99

&lt;151&gt; 1999-07-09

&lt;160&gt; 20

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (2)..(19)

&lt;400&gt; 1

g cac cta ggc aaa ggc ttc

His Leu Gly Lys Gly Phe

1

5

19

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

His Leu Gly Lys Gly Phe

1

5

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (2)..(19)

<400> 3

g cac cta ggg aaa ggc ttc  
His Leu Gly Lys Gly Phe  
1 5

19

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

His Leu Gly Lys Gly Phe  
1 5

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

ctgctgccgc caacctaca

19

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Ala Ala Ala Ala Asn Leu Gln  
1 5

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

ctgctgcccgc caacctaca

19

<210> 8  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 8  
Ala Ala Ala Gly Asn Leu Gln  
1 5

<210> 9  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

<400> 9  
ttattaataa tctgggtttt gtgtc

25

<210> 10  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

<400> 10  
gggaagagct agttaaag ttgtg

25

<210> 11  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Primer

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

&lt;400&gt; 11

cggaattctg aaattattta taatctgggt ttgtgtc

38

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 37

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Primer

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

&lt;400&gt; 12

cggaattcat cggggaagag ctaagttaa agttgtg

37

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Primer

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

&lt;400&gt; 13

gccagtgacc attaacacct ttgga

25

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Primer

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

&lt;400&gt; 14

ccgtcttcaa agcctgcctc agtggctggc

30

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Primer

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

&lt;400&gt; 15

cggaattcgc cagtgaccat taacaccttt tga

33

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Primer

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

&lt;400&gt; 16

cggaattctg cagcaagcca gtcacagca gct

33

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Primer

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

<400> 17  
cggaattctg gtctcactgt gtttccactc atc 33

<210> 18  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

<400> 18  
cggaattcgc cagggtgac aagccttttc tca 33

<210> 19  
<211> 46  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

<400> 19  
gccagaggag attttgcagc tgctgccggc aacctacaaa cctgcc 46

<210> 20  
<211> 46  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

<400> 20  
ggcaggtttg taggttgccg gcagcagctg caaaatctcc tctggc 46